



**Cátia Patrícia  
Simões Pinto**

**Contribuição da imunofenotipagem para o  
diagnóstico da Síndrome Mielodisplásica**

**Immunophenotyping contribution for the diagnosis  
of Myelodysplastic Syndrome**



Universidade de Aveiro Departamento de Química  
Ano 2015/2016

**Cátia Patrícia  
Simões Pinto**

## **Contribuição da imunofenotipagem para o diagnóstico da Síndrome Mielodisplásica**

### **Immunophenotyping contribution for the diagnosis of Myelodysplastic Syndrome**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica com especialização em Bioquímica Clínica, realizada sob orientação do Professor Doutor Artur Augusto Paiva, Assessor da Unidade de Gestão Operacional de Citometria do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, e da Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira, Professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.



universidade  
de aveiro

Dedico este trabalho à minha Mãe e à minha Irmã.

## **o júri**

Presidente

**Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues**

professor auxiliar no Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor Artur Augusto Paiva**

coordenador da Unidade de Gestão Operacional de Citometria do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

**Prof. Doutora Ana Bela Sarmento Antunes Cruz Ribeiro**

professora auxiliar com agregação na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

## **Agradecimentos**

Obrigada ao Doutor Artur Paiva por todo o conhecimento partilhado e à Professora Rita Ferreira pela sua incansável preocupação e apoio.

Agradeço à Doutora Emília Cortesão, à Doutora Letícia Ribeiro e à Doutora Helena Vitória do Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e do Centro Hospitalar Tondela Viseu, respetivamente, pelo fornecimento das amostras.

Agradeço a toda a equipa da Unidade de Gestão Operacional de Citometria e à Doutora Paula Laranjeira pela sua disponibilidade e auxílio ao longo de todas as etapas.

O meu sincero agradecimento à equipa do laboratório de hemato-oncologia do Hospital Pediátrico de Coimbra, em especial à Doutora Margarida Coucelo pela sua amável simpatia e encorajamento.

Obrigada Ana, Catarina e Sofia por todos os momentos partilhados e por todo o espírito de interajuda.

Obrigada a toda a minha família pelo apoio incondicional.

Por fim, o agradecimento mais especial e importante, à minha Mãe e Irmã pelos valores que me transmitiram. Obrigada por me ensinarem a conquistar batalhas e a lutar pelos meus sonhos. Só o vosso carinho, força e a nossa forte união me permite superar qualquer obstáculo.

## Palavras-chave

Síndrome Mielodisplásica; Leucemia Mielóide Aguda; Citometria de Fluxo; Imunofenotipagem

## Resumo

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) constitui um grupo heterogêneo de neoplasias mielóides caracterizados por alterações nos processos de diferenciação e maturação celular. O contributo da citometria de fluxo no diagnóstico da patologia ainda não está bem estabelecido, contudo, desde 2014 o International Leukemia Net European Working Group recomenda a integração da técnica para o diagnóstico destas entidades. Quer a morfologia quer a imunofenotipagem tentam encontrar rasgos displásicos nas linhas maioritárias da medula óssea (MO). Neste contexto, o objetivo deste estudo incidiu na análise das linhas minoritárias da MO como a linha a basófilo, eosinófilo, célula dendrítica plasmacitóide e mastócito, de forma a verificar se estas são fenotipicamente diferentes na hematopoiese normal ou displásica. As amostras analisadas (n=84) encontravam-se distribuídas, de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde, em: 8 CRDU, 45 CRDM, 17 AREB-1 e 14 AREB-2. Baseado no International Prognostic Scoring System, 18 foram classificadas como de Baixo risco, 19 como de risco Intermédio1 e 16 como de risco Intermédio2-Alto. Paralelamente, analisaram-se 14 MO normais/reactivas. Nas diferentes linhas hematopoiéticas estudadas, foi calculada a percentagem de células nos diferentes estadios maturativos e a expressão dos recetores: CD10, CD11b, CD13, CD33, CD34, CD35, CD44, CD45, CD64, CD117, CD123, CD133 e HLA-DR. Procedeu-se à análise da expressão dos genes *Tryptase* e *Peroxidase do Eosinófilo* para amostras de basófilos e eosinófilos, correspondentemente, em 9 amostras diagnosticadas com SMD e em 5 MO normais/reactivas. Observou-se um aumento da expressão de CD44 e CD45 transversal às linhas hematopoiéticas estudadas, um aumento de expressão de CD117 e HLA-DR na linha a mastócito, uma diminuição de CD13 na linha a basófilo e de CD35 e CD64 na linha a eosinófilo. Na análise da expressão génica, observou-se um aumento de expressão dos genes *Tryptase* e *Peroxidase do Eosinófilo* para as populações de basófilos e eosinófilos, respetivamente, nas amostras da SMD. Os resultados obtidos claramente demonstram padrões alterados nas linhas hematopoiéticas estudadas consistentes com os publicados para a linha granulocítica, monocítica e eritroide, reforçando o contributo da citometria de fluxo para o diagnóstico e estratificação prognóstica dos doentes com SMD.

## Keywords

Myelodysplastic Syndrome; Acute Myeloid Leukemia; Flow Cytometry; Immunophenotyping.

## Abstract

The Myelodysplastic Syndrome (MDS) is a heterogeneous group of myeloid neoplasms characterized by changes in the differentiation and maturation of myeloid cells. The contribution of immunophenotyping for the diagnosis of MDS is not well established, however, since 2014 the International Leukemia Net European Working Group recommends the integration of flow cytometry for the diagnosis of these entities. Either morphology or immunophenotyping try to find dysplastic rips in the majority hematopoietic lineages of bone marrow (BM). In this context, the aim of this study was to look into the BM minority lineages from MDS patients, such as basophil, eosinophil, plasmacytoid dendritic cells and mast cell lineage, in order to verify if they are phenotypically different from normal/reactive bone marrow BM. MDS patients were distributed (n=84), according to the World Health Organization classification as: 8 RCUD, 45 RCMD, 17 RAEB-1 and 14 RAEB-2. Based on the International Prognostic Scoring System, 18 cases were Low risk MDS, 19 were intermediate risk-1 and 16 had classified as intermediate risk-2 and high-risk. Additionally, we analysed 14 normal/reactive BM. In the different hematopoietic lineages, the percentage of cells in different maturation stages and expression of several receptors, like CD10, CD11b, CD13, CD33, CD34, CD35, CD44, CD45, CD64, CD117, CD123, CD133 and HLA-DR were studied. We analysed the *Tryptase* and *Eosinophil Peroxidase* gene expression to basophils and eosinophils population, respectively, in 9 MDS samples and in 5 normal/reactive BM. There were an increased expression in CD44 and CD45 in all hematopoietic lineages under study, an increased expression in CD117 and HLA-DR in mast cell lineage, a decreased expression in CD13 in basophil lineage and in CD35 and CD64 in eosinophil lineage. In gene expression analysis there were, in MDS samples, an increased expression in *Tryptase* and *Eosinophil Peroxidase* genes for basophils and eosinophils populations, respectively. Regarding our results, there were immunophenotypic and functional differences in hematopoietic lineages studied consistent with those published to granulocytic, monocytic and erythroid lineages. This enhancing the contribution of flow cytometry for the diagnosis and prognostic stratification of MDS patients.

# Índice

---



## Índice

Abreviaturas.....	XIII
Capítulo 1-Síndrome Mielodisplásica .....	3
Capítulo 2-Etiologia da Síndrome Mielodisplásica .....	4
Capítulo 3- Bases genéticas da Mielodisplasia .....	5
3.1-Mecanismos fisiopatológicos inerentes .....	5
3.2-Alterações citogenéticas recorrentes .....	7
3.2.1-Alterações cromossómicas .....	7
3.2.2-Mutações genéticas.....	8
Capítulo 4-Classificação e Diagnóstico da Síndrome Mielodisplásica.....	10
4.1-Classificação e Prognóstico .....	10
4.2-Critérios de Diagnóstico .....	14
Capítulo 5-Citometria de Fluxo no apoio ao diagnóstico da Síndrome Mielodisplásica .....	16
5.1-Abordagem à Citometria.....	16
5.2-Identificação de populações celulares na medula óssea.....	16
5.2-Principais alterações na Síndrome Mielodisplásica .....	18
Capítulo 6-Estratégias Terapêuticas.....	21
Capítulo 7-Objetivo .....	25
Capítulo 8-Materiais e Métodos .....	29
8.1-Caraterização Imunofenotípica .....	29
8.1.1-População em estudo.....	29
8.1.2-Caraterização da linha a basófilo, eosinófilo, célula dendrítica plasmacitóide e mastócito.....	31
8.1.4-Análise Estatística .....	32
8.2-Expressão dos genes <i>Triptase</i> e <i>Peroxidase do Eosinófilo</i> .....	33
8.2.1-População em estudo.....	33
8.2.3-Análise de expressão dos genes <i>Triptase</i> e <i>Peroxidase do Eosinófilo</i> .....	34
8.2.4-Análise Estatística .....	35
Capítulo 9-Resultados .....	39

9.1-Caraterização Imunofenotípica .....	39
9.2-Expressão dos genes <i>Triptase</i> e <i>Peroxidase do Eosinófilo</i> .....	51
Capítulo 10-Discussão dos Resultados .....	55
10.1-Caraterização Imunofenotípica .....	55
10.2-Expressão dos genes <i>Triptase</i> e <i>Peroxidase do Eosinófilo</i> .....	59
Capítulo 11-Conclusão .....	63

## Índice de Figuras

Figura 1-Contribuição de alterações genéticas e epigenéticas na diversidade fenotípica e no mecanismo fisiopatológico da SMD. Adaptado de (21). ..... 10

Figura 2-(A) Representação esquemática da geração de dados através da técnica de citometria de fluxo. As células provenientes de uma suspensão são aspiradas através de uma câmara de fluxo de forma a passarem uma por uma em frente a três raios laser. O sinal digital gerado pela quantidade de luz que atinge os diferentes detectores é processado por um computador equipado com software dedicado à análise de dados. (B) Representação gráfica em 2D dos pontos de dados correspondentes à passagem de cada célula: FSC vs SSC (C) SSC vs CD45 (D) SSC vs CD38. Adptado de (72). ..... 17

Figura 3-Dot plot bidimensional que ilustra as diferentes populações celulares identificáveis por citometria de fluxo, numa MO normal. (A) Identificação das populações celulares com base na expressão de CD45 e (B) Identificação das mesmas populações celulares de acordo com o tamanho e complexidade: a rosa os eosinófilos; a azul os neutrófilos, a amarelo os monócitos, a laranja os linfócitos, a vermelho os precursores hematopoiéticos CD34<sup>+</sup>; (C) Identificação dos estádios de maturação na linha a neutrófilo com base na expressão de CD13 e CD11b: a azul-ciano os mieloblastos, a azul-turquesa os promielócitos, a azul os mielócitos e metamielócitos e a azul-escuro os neutrófilos em banda e maduros; (D) Identificação das populações celulares de basófilos e células dendríticas plasmacitóides com base na expressão de CD123 e HLA-DR: a rosa os basófilos, a verde as células dendríticas plasmacitóides; (E) Identificação da população de mastócitos com base na expressão de CD117. .... 19

Figura 4-Dot plot bidimensional que ilustra os diferentes estádios maturativos das diferentes linhas hematopoiéticas em estudo numa MO normal (A-L). (A) CD13 vs CD11b, (B) CD45 vs CD35, (C) CD45 vs CD33, (D) CD123 vs CD35 para a identificação de dois estádios maturativos na linha a basófilo (E) CD13 vs CD11b, (F) CD64 vs CD35, para definir três estádios maturativos na linha a eosinófilo, (G) CD71 vs CD33, (H) CD35 vs CD44 para identificação de apenas dois estádios maturativos na linha a eosinófilo (estádio I e II agrupado) (I) CD123 vs HLA-DR para identificação da população total, (J) CD117 vs HLA-

DR para definir dois estadios na linha a célula dendrítica plasmacitóide. (L) CD117<sup>ele</sup> para identificação da linha a mastócito ..... 32

Figura 5-Gráficos de expressão de CD44, CD45 e CD13, dados pela média de intensidade de fluorescência (MIF), para a linha a basófilo e para os diferentes grupos da SMD mediante a classificação OMS (2008) e o sistema IPSS (1997). As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3ºquartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança. Com significado estatístico para  $p < 0,05$  Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney: a) vs grupo Controlo, b) vs CRDU, c) vs CRDM e d) vs Baixo risco. (A1-C1) Classificação OMS (2008); (A2-C2) Sistema IPSS (1997). (A) Expressão de CD44; (B) Expressão de CD45; (C) Expressão de CD13..... 40

Figura 6-Gráficos de expressão de CD44, CD45, CD35 e CD64, dados pela média de intensidade de fluorescência (MIF), para a linha a eosinófilo e para os diferentes grupos da SMD mediante a classificação OMS (2008) e o sistema IPSS (1997). As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3ºquartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança. Com significado estatístico para  $p < 0,05$  Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney: a) vs grupo Controlo, b) vs CRDU e c) vs Intermédio1 (A1-D1). Classificação OMS (2008); (A2-D2) Sistema IPSS (1997). (A) Expressão de CD44; (B) Expressão de CD45; (C) Expressão de CD35; (D) Expressão de CD64. .... 43

Figura 7-Gráficos de expressão de CD44 e CD45, dados pela média de intensidade de fluorescência (MIF), para a linha a célula dendrítica plasmacitóide e para os diferentes grupos da SMD mediante a classificação OMS (2008) e o sistema IPSS (1997). As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3ºquartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança. Com significado estatístico para  $p < 0,05$  Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney: a) vs grupo Controlo, b) vs CRDU , c) vs Baixo risco e d) vs Int1. (A1-B1) Classificação OMS (2008); (A2-B2) Sistema IPSS (1997). (A) Expressão de CD44; (B) Expressão de CD45.46

Figura 8- Gráficos de expressão de CD45, CD117 e HLA-DR, dados pela média de intensidade de fluorescência (MIF), para a linha a mastócito e para os diferentes grupos da SMD mediante a classificação OMS (2008) e o sistema IPSS (1997). As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3ºquartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança. Com significado estatístico para  $p < 0,05$  Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney: a) vs grupo Controlo; b) vs CRDU, c) vs CRDM e d) vs Int1. (A1-C1) Classificação OMS (2008); (A2-C2) Sistema IPSS (1997). (A) Expressão de CD45; (B) Expressão de CD117; (C) Expressão de HLA-DR. .... 49

Figura 9-Expressão dos genes Triptase e Peroxidase do Eosinófilo em amostras de MO normais/reativas (grupo Controlo) e MO diagnosticadas com SMD de acordo com os critérios propostos pela OMS (2008). (A) Expressão do gene Triptase para a população de basófilos; (B) Expressão do gene Peroxidase do Eosinófilo para a população de eosinófilos. Valores dados pela normalização da expressão do gene em estudo com o gene de referência GAPDH, pelo método do delta-Ct. As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3ºquartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança. Com significado estatístico para  $p < 0,05$  Teste de Mann-Whitney: \* vs grupo Controlo. .... 51

## Índice de Tabelas

Tabela 1-Classificação da SMD mediante as guidelines propostas pela OMS em 2008. Adaptado de (60). .... 12

Tabela 2-Estratificação prognóstica da SMD proposta pelo IPSS, em 2012. Adaptado de (64). .... 14

Tabela 3-Alterações celulares e imunofenotípicas frequentemente identificadas em SMD, no compartimento  $CD34^+$  e nas linhas granulocítica/neutrófilo, monocítica e eritróide. Adaptado de (80–83). .... 20

Tabela 4-Caraterização clínica (sexo e média de idades) dos diferentes grupos da SMD que integraram o estudo retrospectivo, de acordo com a classificação OMS (2008) e IPSS (1997). .....	29
Tabela 5-Combinação dos anticorpos monoclonais em oito fluorescências e respetiva especificidade e fonte comercial do reagente para os tubos em estudo. Os tubos assinalados com * integram o painel LMA/SMD de 8 cores proposto pelo consórcio Euroflow (95). .	30
Tabela 6-Conjunto de primers (Forward e Reverse) e temperaturas de annealing utilizadas para a expressão dos genes GAPDH, TPS e EPX. ....	34
Tabela 7-Esquema do perfil da reação de qRT-PCR utilizado para a expressão dos genes em estudo.....	35
Tabela 8-Frequência das células da linha a basófilo na celularidade global da MO e percentagem dos estadios maturativos na frequência celular da linha a basófilo; expressão dos recetores celulares importantes na maturação da linha a basófilo, dado pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Dados obtidos em MO normais/reativas (grupo Controlo) vs doentes diagnosticados com SMD e estratificados segndo a OMS (2008) e IPSS (1997). ....	41
Tabela 9-Frequência das células da linha a eosinófilo na celularidade global da MO e percentagem dos estadios maturativos na frequência celular da linha a eosinófilo; expressão dos recetores celulares importantes na maturação da linha a eosinófilo, dado pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Dados obtidos em MO normais/reativas (grupo Controlo) vs doentes diagnosticados com SMD e estratificados segundo a OMS (2008) e IPSS (1997). ....	44
Tabela 10-Frequência das células da linha a célula dendrítica plasmacitóide na celularidade global da MO e percentagem dos estadios maturativos na frequência celular da linha célula dendrítica plasmacitóide; expressão dos recetores celulares importantes na maturação da linha a célula dendrítica plasmacitóide, dado pela média de intensidade de fluorescência	

(MIF). Dados obtidos em MO normais/reativas (grupo Controlo) vs doentes diagnosticados com SMD e estratificados segundo a OMS (2008) e IPSS (1997)..... 47

Tabela 11-Frequência das células da linha a mastócito na celularidade global da MO; expressão dos recetores celulares importantes na maturação da linha a mastócito, dado pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Dados obtidos em MO normais/reativas (grupo Controlo) vs doentes diagnosticados com SMD e estratificados segundo a OMS (2008) e IPSS (1997). ..... 50





## **Abreviaturas**

---



## **Abreviaturas**

ADMT- Ácido Desoxirribonucleico Metiltransferase

ADN- Ácido Desoxirribonucleico

AR- Anemia Refratária

AREB- Anemia Refratária com Excesso de Blastos

AREB-t- Anemia Refratária com Excesso de Blastos em transformação

ARSA- Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel

*ASXL1- Sex Comb Like 1*

CMF- Citometria de Fluxo

CpG- Citosina-fosfato-Guanina

*CR1- Complement receptor 1*

CRDM- Citopenia Refratária com Displasia

CRDU- Citopenia Refratária com Displasia

Del(q)- Deleção do braço longo do cromossoma

Del(p)- Deleção do braço curto do cromossoma

*EGR1- Early Growth Response Protein 1*

*EPX- Peroxidase do Eosinófilo*

FAB- French-American-British

FSC- Forward Scatter

HLA-DR- *Human Leucocyte Antigen*

*IDH- Isocitrate Dehydrogenase*

IgG- Imunoglobulina G

*INK- Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors*

IPSS- International Prognostic Scoring System

IPSS-R- Revised International Prognostic Scoring System

LMA- Leucemia Mielóide Aguda

LMMC- Leucemia Mielomonocítica

MO- Medula Óssea

MPO- Mieloperoxidase

NADPH- Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NCCN- National Comprehensive Cancer Network

OMS- Organização Mundial de Saúde

RT-qPCR- Reação de polimerização em cadeia em tempo real

*RUNX1- Runt-Related Transcription Factor 1*

SSC- Sideward Scatter

SMD- Síndrome Mielodisplásica

SMD-DU- Síndrome Mielodisplásica com Displasia Unilinha

SMD-DM- Síndrome Mielodisplásica com Displasia Multilinha

SMD-EB- Síndrome Mielodisplásica com Excesso de Blastos

SMD-SA- Síndrome Mielodisplásica com Sideroblastos em Anel

SMD-SA-DU- SMD-SA com Displasia Unilinha

SMD-SA-DM- SMD-SA com Displasia Multilinha

SMD-t- Síndrome Mielodisplásica secundária ao tratamento

SMD-i- Síndrome Mielodisplásica inclassificável

SP- Sangue Periférico

*TET2- TET Methylcytosine Dioxygenase 2*

*TPS- Triptase*

*TP53- Tumor Protein p53*

VIH- Vírus da Imunodeficiência Humana

## **Estado da arte**

---



## **Capítulo 1-Síndrome Mielodisplásica**

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) representa um grupo heterogêneo de neoplasias mielóides clonais na medula óssea (MO), caracterizadas por uma alteração na diferenciação e maturação das células mielóides, bem como, falência da medula óssea (1). Esta patologia apresenta risco de evolução para Leucemia Mielóide Aguda (LMA) mediante o fenótipo clínico e patogénico. O fenótipo clínico difere quanto ao número e gravidade de citopenias, celularidade e contagem de blastos na MO, taxa de sobrevivência e resposta ao tratamento (2). O fenótipo patogénico é caracterizado por displasia de uma ou mais linhas mielóides e os seus mecanismos estão associados a alterações biológicas e moleculares refletidos na heterogeneidade da SMD (3). Esta síndrome é maioritariamente diagnosticada no sexo masculino e numa faixa etária superior a setenta anos (4,5).

Na Europa, a Síndrome Mielodisplásica é considerada a terceira causa mais comum de neoplasias mielóides. A sua incidência é mais elevada em Países Nórdicos e mais baixa em Países localizados a Este. Porém, quando comparada com os Estados Unidos da América, verifica-se uma menor taxa de incidência Europeia. Mudanças na classificação, inconsistência nos critérios de diagnóstico, ausência de registos e, por outro lado o diagnóstico excessivo nos Estados Unidos da América, limitam a qualidade dos dados e dificultam a comparação entre populações (5).

Em 1938, Rhoads e Barker diagnosticaram pela primeira vez “anemia refratária” tendo como base o grau de anemia, a presença de macrocitose, leucopenia e de células polimorfonucleares tóxicas (6). Mais tarde, em 1953, um estudo norte-americano, que incluía a análise de doze casos evidenciou a conexão entre anemia e leucemia (7). Em 1956, Bjorman descreveu quatro casos de anemia sideroblástica adquirida. O investigador clínico observou a presença de quantidades excessivas de ferro livre intracelular nos normoblastos e relacionou a patologia com uma anomalia na síntese de hemoglobina e vacuolização, o que referiu como evidências de degeneração (8). Em 1969, William Dameshek sugere que a definição clássica de “mieloproliferativa” deveria ser expandida e incluir a hemoglobinúria paroxística noturna e outras síndromes pré-leucémicas (9,10). Quatro anos após a sugestão de Dameshek, um grupo universitário observou que alguns dos doentes diagnosticados com pré-leucemia nunca desenvolveram leucemia e, como tal, “mielodisplasia” seria mais adequado ao invés de “pré-leucémica” (11). Em 1976, o grupo cooperativo Francês-Americano-Britânico (FAB) definiu classificações, nomenclaturas e sugeriu duas novas

categorias de “síndromes dismielopoiéticas” facilmente confundíveis com LMA: Anemia Refratária com Excesso de Blastos e Leucemia Mielomonocítica (12). Por fim, em 1982, o mesmo grupo introduziu a “Síndrome Mielodisplásica” e propôs *guidelines* para o seu diagnóstico e classificação (13).

## **Capítulo 2-Etiologia da Síndrome Mielodisplásica**

A SMD pode manifestar-se sob a forma primária ou *de novo* e secundária (14). A forma da SMD primária é caracterizada por uma exposição a agentes tóxicos, sendo associada principalmente à exposição sistemática ao benzeno (15). O padrão fisiopatológico predominante consiste numa displasia em múltiplas linhas hematopoiéticas, eosinófilos anormais, hemofagocitose e degeneração do estroma. Doentes expostos a elevadas concentrações de benzeno apresentam anomalias imunológicas, mais concretamente, aumento na circulação de linfócitos granulares, distribuição alterada de células T bem como expansão clonal de subpopulações na MO (16). Os hábitos tabágicos estão, também, significativamente relacionados com o desenvolvimento da SMD (14). Esta associação é facilmente perceptível a nível biológico uma vez que, para além de que os cigarros são hoje em dia a maior fonte de exposição a benzeno, estes contêm outros carcinogénicos e elementos radioativos que induzem alterações cromossómicas (17). Os pesticidas, agroquímicos, radiações ionizantes, como é o caso do raio-X usado para diagnóstico e tratamento são, ainda, identificados como potenciais agentes etiológicos da SMD (4).

A SMD secundária tem como origem uma terapia citotóxica prévia (SMD-t), como é o caso da quimioterapia e/ou radioterapia (14). A citogenética destes doentes revela alterações cromossómicas significativas sobretudo nos cromossomas 5 e 7, sendo predominante alterações como deleção, rearranjo, duplicação e anomalias clonais. Por norma, a faixa etária em que surge a SMD secundária é inferior à da SMD primária, sendo o pico de incidência 4 a 6 anos após a terapêutica (18).

A etiologia da SMD permanece desconhecida na maioria dos casos. Infere-se que causas ambientais, toxicidade de xenobióticos e predisposições genéticas de baixa frequência possam ser responsáveis por alguns dos casos (4). O diagnóstico da SMD *de novo* em crianças, jovens e adultos de meia-idade encontra-se, sobretudo, associado a uma predisposição genética subjacente (19). Citogeneticamente caracteriza-se por duplicações, isocromossomia, monossomia isolada do cromossoma 7 e outras irregularidades. A nível



molecular, verifica-se que a interrupção bi-alélica de genes pode refletir uma mutação somática leucemogénica em doentes com alterações hereditárias no gene afetado (20). A compreensão da etiologia torna-se fulcral para a elucidação dos mecanismos patogénicos, métodos de diagnóstico e para a diferenciação em grupos (4).

### **Capítulo 3- Bases genéticas da Mielodisplasia**

#### **3.1-Mecanismos fisiopatológicos inerentes**

Alterações nas células estaminais e alterações epigenéticas associadas a um aumento de apoptose, sistema imune débil e a modificações na resposta mediada por citocinas podem contribuir para o desenvolvimento da SMD. Populações clonais de células mesenquimais, células endotéliais circulantes e células estaminais hematopoiéticas primitivas já foram observadas na patologia (21). Estas populações clonais dão origem a um fenótipo idêntico a SMD quando transplantadas, *in vivo*, em modelos animais severamente imunodeficientes, comprovando a sua capacidade de indução cancerígena (22). Por outro lado, a interferência farmacológica nos processos de autorenovação e nos nichos de células estaminais explicam a resposta inadequada e transiente dos doentes com SMD à quimioterapia convencional (23,24).

As alterações epigenéticas correspondem, essencialmente, à metilação/desmetilação do ácido desoxirribonucleico (ADN) e à acetilação/desacetilação de histonas. A metilação do ADN é controlada por uma família de ADN metiltransferases (ADMT). ADMT3a e ADMT3b são responsáveis por metilações *de novo* e a ADMT1 mantém o estado de metilação durante o processo de divisão celular. Recentemente, evidenciou-se a ADMT3 como fulcral para a diferenciação de células estaminais hematopoiéticas (25). A hipermetilação de zonas Citosina-fosfato-Guanina (CpG) de genes promotores, catalisados por ADMT, conduz a uma estrutura de cromatina compacta e a alterações no processo de transcrição resultando, frequentemente, no silenciamento de genes supressores de tumor. Vários processos biológicos fundamentais poderão ser afetados por esta regulação epigenética tais como, mecanismo de reparação de ADN, controlo do ciclo celular e apoptose (26). A adição de grupos metil nos genes envolvidos no controlo do ciclo celular e na apoptose é mais comum em SMD que apresentam elevado risco de evolução para LMA. Em aproximadamente 50% destes doentes, a transcrição do gene *Cyclin Dependent Kinase Inhibitors (INK4b)*, fulcral na regulação do ciclo celular encontra-se silenciada devido à

metilação anormal na sua região promotora (27). A metilação de ADN e a acetilação de histonas estão relacionadas: a acetilação de resíduos de aminoácidos das histonas catalisadas pela histona acetiltransferase conduz a uma destabilização da interação das histonas com o ADN. Esta destabilização reflete-se numa abertura na estrutura do nucleossoma e, subsequentemente, numa permissão para transcrição. As histonas desacetilases removem o grupo acetil das histonas estabilizando a estrutura de cromatina e as sequências promotoras afetadas conduzindo ao silenciamento de genes nessa região. Estas alterações são associadas a um pior prognóstico em estádios precoces da SMD (28).

A apoptose detém um papel essencial na homeostasia dos tecidos, incluindo no sistema hematopoiético. É amplamente aceite que um desequilíbrio nos processos apoptóticos e anti-apoptóticos seja crucial na progressão da SMD para LMA (29). Nos doentes com SMD em estádios iniciais as células são mais propensas a apoptose enquanto em estádios mais avançados há menor taxa apoptótica e maior incidência de características proliferativas (30). Nesta patologia, o recetor FAS é expresso em níveis elevados na superfície de precursores eritróides maduros e há aumento da ativação de caspases, o que pode estar subjacente a uma alteração nos mecanismos de diferenciação celular. Esta modificação contribui para o aumento de apoptose e alteração no processo de diferenciação de linhagens celulares (31).

A hematopoiese ineficaz pode ainda ser explicada por uma desregulação imune que induz mielosupressão autoimune (32). Nesta patologia verifica-se uma expansão policlonal pronunciada de células T auxiliaadoras (CD4) e T citotóxicas (CD8) no Sangue Periférico (SP) e na MO nos grupos de baixo risco (33). Alterações no microambiente da MO são também características da SMD. Níveis de fatores de crescimento endoteliais vasculares e algumas citocinas inflamatórias encontram-se elevadas na MO destes doentes (34). Estas alterações poderão resultar de uma complexa interação entre células hematopoiéticas anormais e a resposta imune adaptativa. A interação permite a ativação do sistema imune inato e contato celular mediado por interações com o estroma, influenciando negativamente a hematopoiese normal e evidenciando uma potencial explicação para a ocorrência de citopenias. Embora as modificações no estroma não sejam sempre consequência de uma hematopoiese anormal, é demonstrado que uma alteração na célula primária do estroma poderá resultar em displasia nas células hematopoiéticas normais (35). Não obstante, o fenótipo displásico e apoptótico, verificado em SMD, não é explicado por uma única alteração. Diversos mecanismos associados a mutações, expressão excessiva de oncogenes

e translocações balanceadas têm sido descritos, embora não seja clara uma ligação entre as alterações moleculares e o fenótipo exibido (2,36).

### **3.2-Alterações citogenéticas recorrentes**

#### **3.2.1-Alterações cromossómicas**

O conjunto de alterações genéticas mais frequentes, como possível causa da SMD, inclui deleções e/ou amplificações genéticas, mutações que alteram a sequência ou expressão de genes individuais e anomalias epigenéticas (2). As alterações cromossómicas mais comuns consistem na deleção do braço longo do cromossoma 5 (del(5q)), del(7q) e del(20q), (-7) e (-Y) e por fim na trissomia 8 (+8) (37).

Com uma incidência de 15%, as deleções 5q são as alterações citogenéticas mais frequentes e encontram-se associadas a um prognóstico relativamente favorável (38). A análise minuciosa de pontos de rotura de 5q, em doentes com SMD, localizou duas regiões comumente deletadas distintas. A região comumente deletada mais distal 5q33.1 está conectada com um fenótipo clínico, denominado de síndrome 5q, caracterizado por anemia macrocítica severa, trombocitemia relativa e baixo risco de progressão para LMA. Por outro lado, a região comumente deletada proximal localizada no 5q31 está associada com a SMD-t exibindo um fenótipo mais agressivo (39,40). Esta alteração compromete a função do gene *Early Growth Response Protein 1 (EGR1)*, um supressor tumoral. Contraditoriamente às deleções 5q, a monossomia do cromossoma 7 ou perda intersticial de 7q está relacionada com um prognóstico desfavorável e apresenta uma taxa de incidência de 10% (41). As regiões comumente deletadas no cromossoma 7 já identificadas correspondem a 7q36 e 7q22, porém as lesões moleculares subjacentes ao desenvolvimento da SMD ainda se encontram por caracterizar (42,43). A trissomia 8 encontra-se presente em aproximadamente 8% dos doentes. Esta alteração cromossómica é considerada de risco intermédio e os doentes apresentam metade da esperança média de vida dos portadores de um cariótipo normal (41). Nesta trissomia verifica-se a presença de uma expansão policlonal de células T (CD8<sup>+</sup>) e, como tal, apresentam uma resposta positiva à terapia imunossupressora (44). Doentes com o cariótipo del(20q) ou (-Y) são considerados no mesmo grupo de risco citogenético que os doentes com cariótipo normal. A perda do cromossoma Y não parece estar relacionada com a patogénese da doença. Por outro lado as regiões comumente deletadas do cromossoma 20, deduzidas através de doentes diagnosticados com SMD e LMA, incluem 19 genes dos quais

9 estão correlacionados com a patogénese das doenças mielóides (45,46). Como expectável, verifica-se uma extensa variedade de anomalias genéticas associadas a SMD. As alterações cromossómicas poderão ser úteis para a confirmação da presença de hematopoiese clonal e na monitorização da resposta ao tratamento (2).

### 3.2.2-Mutações genéticas

Um número não específico de mutações genéticas têm sido descritos em doentes com SMD (21). O gene *Tet Methylcytosine Dioxygenase 2 (TET2)*, localizado no cromossoma 4q24, é o gene que se encontra mais frequentemente mutado em SMD, com uma taxa de incidência de aproximadamente 20%. Mutações no *TET2* poderão estar na origem de uma etapa patogénica comum a todos os neoplasmas mielóides que poderá ser caracterizada pelo aparecimento ou aumento de uma dominância clonal na célula lesada de origem (47). As mutações no gene *Sex-Comb Like-1 (ASXL1)* têm sido descritas em aproximadamente 10% dos doentes (48). O gene *Runt-Related Transcription Factor 1 (RUNX1)* é o segundo gene mais frequentemente mutado sendo associado a um prognóstico desfavorável (49). Mutações *missense* neste gene estão agrupadas no domínio runt, tornando-se fisiologicamente relevantes uma vez que prejudicam a ligação ao ADN. Estas mutações poderão reduzir a atividade do gene *RUNX1* não se refletindo apenas em mutações de perda de função em um alelo (50). Adicionalmente, dois genes *Isocitrate Dehydrogenase (IDH)*, o *IDH1* e *IDH2*, foram identificados como oncogenes mutados em elevada percentagem em glioma e descritos em SMD. Estas mutações codificam enzimas mutantes que apresentam alteração na especificidade para o substrato. Assim, em vez de gerarem uma molécula de Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH), na catalisação da conversão de isocitrato em  $\alpha$ -cetoglutarato, enzimas IDH mutantes consomem NADPH enquanto convertem  $\alpha$ -cetoglutarato em 2-hidroxiglutarato (51). Ainda não se encontra descrito se este produto é diretamente oncogénico ou se o NADPH e a depleção do  $\alpha$ -cetoglutarato contribuem para a leucemogénese (2). O *Tumor Protein p53 (TP53)* é um gene localizado no cromossoma 17q sendo considerado um gene supressor de tumor com extrema relevância. Em modelos animais a proteína p53 é ativada por diversos mediadores de stress celular e contribui para que haja terminação do ciclo celular, indução de mecanismos de reparo do ADN e condução da célula a apoptose. Mutações *TP53* são frequentes em diversos tipos de tumor resultantes de uma instabilidade genómica (52). Em SMD, a frequência destas mutações é variável entre

5 a 15%, sendo mais frequentes em doentes com história clínica de exposição a agentes tóxicos (53). A proteína Nucleophosmin1 (NPM1) é uma proteína multifuncional com capacidade de transição entre o núcleo e o citoplasma. Esta proteína participa em diversos processos celulares, nomeadamente, na biogénese ribossomal, controlo do ciclo celular, manutenção da estabilidade genómica e regulação da transcrição de ADN através da modulação no processo de condensação da cromatina (54). Aproximadamente 5% dos doentes com SMD apresentam mutações no gene que codifica esta proteína, sendo mais frequentes em LMA (55,56). Em modelos animais a haploinsuficiência de NPM1 origina um fenótipo idêntico a SMD e a percentagem de mutações aumenta em fenótipos relacionados com LMA. Estes dados sugerem que mutações NPM1 não detêm um papel crucial na fisiopatologia da SMD mas sim na progressão da doença para LMA (57). A definição completa de alterações citogenéticas providenciam mais do que uma taxonomia molecular para esta patologia. A análise de mutações características pode auxiliar no diagnóstico em doentes com citopenias refratárias e morfologias ambíguas. A capacidade de deteção destas alterações associada a características clínicas são potenciais fatores de prognóstico e de previsão à resposta terapêutica (2). De forma sucinta, o desenvolvimento da SMD surge de alterações em células progenitoras hematopoiéticas geneticamente alteradas. Contudo, verifica-se um contributo das alterações genéticas e epigenéticas na diversidade fenotípica, eficiência hematopoiética e suscetibilidade para transformação em LMA. A alteração na resposta imune, nos mecanismos mediados por citocinas e, a resposta do estroma contribuem, ainda, para o fenótipo da doença. Esta análise conjunta é facilmente perceptível na Figura 1 (21).

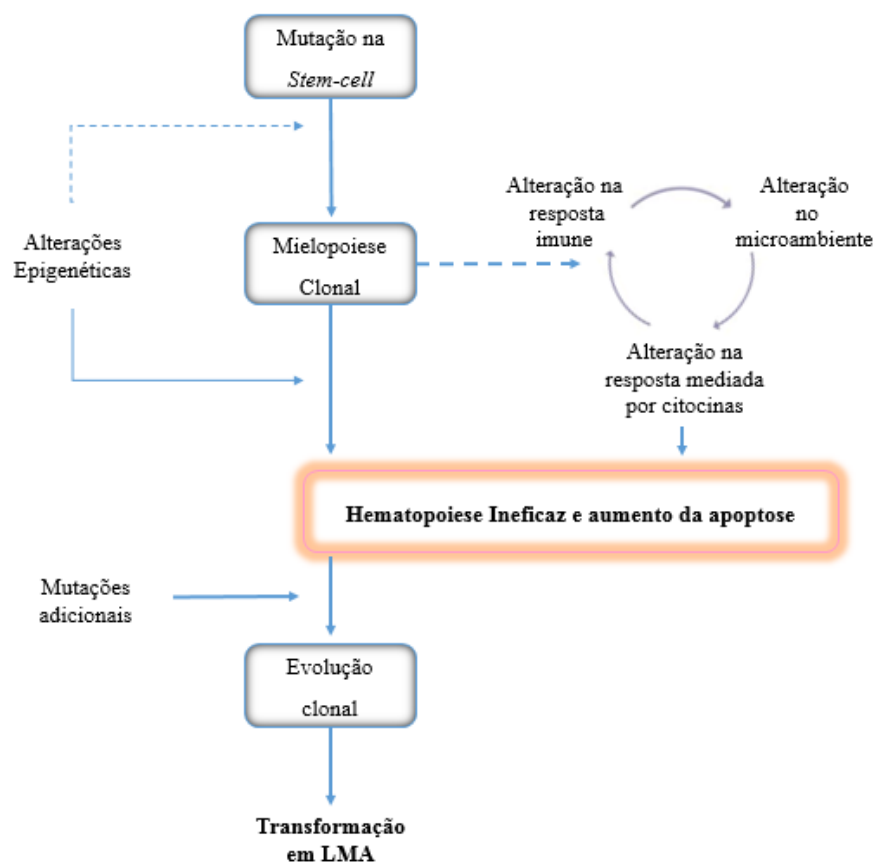


Figura 1-Contribuição de alterações genéticas e epigenéticas na diversidade fenotípica e no mecanismo fisiopatológico da SMD. Adaptado de (21).

## Capítulo 4-Classificação e Diagnóstico da Síndrome Mielodisplásica

### 4.1-Classificação e Prognóstico

A compreensão da SMD tem evoluído nos últimos anos bem como a terminologia para a sua classificação. Face ao crescente conhecimento, vários sistemas de classificação são utilizados no diagnóstico da SMD (58). Em 2008 a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs um sistema de classificação para a SMD que integrou características clínicas, morfológicas, citoquímicas, genéticas e outras informações biológicas pertinentes, de forma a definir entidades com relevância clínica (59,60). Neste sistema de classificação são estratificados sete subgrupos da SMD, mediante alterações presentes no SP e na MO: (I) Citopenia Refratária com Displasia Unilinha (CRDU), (II) Citopenia Refratária com Displasia Multilinha (CRDM), (III) Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA), (IV) e (V) Anemia Refratária com Excesso de Blastos 1 e 2 (AREB-1 e AREB-2), (VI) SMD inclassificável (SMD-i) e (VII) SMD com deleção do braço comprido do cromossoma 5 (SMD del(5q)) (60). A (I) CRDU compreende a anemia, a neutropenia e a trombocitopenia

refratária. No SP poderá se verificar unicitopenia ou bicitopenia e ausência ou baixa frequência de blastos (<1%). A MO deve apresentar displasia em mais de 10% das células de uma linha mielóide, menos de 5% de blastos e menos 15% de precursores eritróides na forma de sideroblastos em anel. O grupo (II) CRDM poderá apresentar, no SP, citopenia, ausência ou baixa percentagem de blastos, ausência de corpos de *Auer* e menos de  $1 \times 10^9/L$  de monócitos. Na MO poderá apresentar displasia em mais de 10% das células de duas ou mais linhas mielóides, menos de 5% de blastos, ausência de corpos de *Auer* e aproximadamente 15% de sideroblastos em anel. O grupo (III) ARSA, no SP, apresenta poucos blastos e poderá apresentar anemia. Na MO, verifica-se que mais de 15% são sideroblastos em anel, poderá se verificar displasia apenas na linha eritróide e menos de 5% de blastos. O grupo (IV) AREB-1 pode apresentar, no SP, citopenias, menos de 5% de blastos, ausência de corpos de *Auer* e menos de  $1 \times 10^9/L$  de monócitos. Na MO, poderá existir displasia unilinha ou multilinha, 5 a 9% de blastos e ausência de corpos de *Auer*. O grupo (V) AREB-2, no SP, apresente frequentemente citopenias, 5 a 19% de blastos, corpos de *Auer* e menos de  $1 \times 10^9/L$  de monócitos. Na MO, poderá existir displasia unilinha ou multilinha, 10 a 19% de blastos e corpos de *Auer*. A SMD-i é o grupo que suscita mais dúvidas quanto ao diagnóstico. No SP verificam-se citopenias e menos de 1% de blastos. Na MO poderá ocorrer displasia inequívoca em menos de 10% das células de uma ou mais linhas mielóides e menos de 5% de blastos bem como, poderão existir anomalias citogenéticas associadas a SMD. Por fim, o grupo (VII) SMD del(5q) poderá apresentar, no SP, anemia, aumento de plaquetas e baixa frequência ou ausência de blastos. Na MO, poderá se observar aumento de megacariócitos, menos de 5% de blastos, ausência de corpos de *Auer* e a deleção do braço comprido do cromossoma 5 é a única alteração citogenética. A Tabela 1 apresenta este sistema de classificação sistematizado (60).

Recentemente, em 2016, a OMS atualizou a classificação da SMD enfatizando as alterações morfológicas, o número de citopenias e a acumulação de alterações genéticas para o diagnóstico e classificação da patologia. A nova classificação substitui o termo “citopenia refratária” e “anemia refratária” por SMD e, como tal, considera os seguintes grupos: (I) SMD com displasia unilinha (SMD-DU), (II) SMD com displasia multilinha (SMD-DM), (III) SMD com sideroblastos em anel (SMD-SA) que se pode subdividir em SMD-SA com displasia unilinha (SMD-SA-DU) e SMD-SA com displasia multilinha (SMD-SA-DM), (IV) SMD com excesso de blastos (SMD-EB) que mediante a percentagem de blastos se pode

subdividir em SMD-EB-1 (entre 5 a 9% de blastos) e SMD-EB-2 (10 a 19% de blastos) e persistem os grupos (V) SMD inclassificável (SMD-i) e (VI) SMD associada à deleção do braço comprido do cromossoma 5 (SMD del(5q)) (61). Visto que este sistema de classificação é extremamente recente, a maioria dos diagnósticos da SMD são realizados com base no sistema de classificação proposto em 2008.

Tabela 1-Classificação da SMD mediante as *guidelines* propostas pela OMS em 2008. Adaptado de (60).

Classificação da OMS (2008)		
Subtipo de SMD	Alterações no SP	Alterações na MO
<b>CRDU</b>	Unicitopenia ou bicitopenia Poucos blastos (<1%)	Displasia unilinhagem <5% blastos <15% dos precursores eritróides são sideroblastos em anel
<b>CRDM</b>	Citopenia Poucos blastos Sem corpos de <i>Auer</i> Monócitos <1x10 <sup>9</sup> /L	Displasia em ≥10% das células de 2 ou mais linhas mielóides <5% blastos Sem corpos de <i>Auer</i> ± 15% de sideroblastos em anel
<b>ARSA</b>	Anemia Sem blastos	≥15% dos precursores eritróides são sideroblastos em anel Apenas displasia eritróide <5% blastos
<b>AREB-1</b>	Citopenia <5% blastos Sem corpos de <i>Auer</i> Monócitos <1x10 <sup>9</sup> /L	Displasia uni ou multilinha 5 a 9% blastos Sem corpos de <i>Auer</i>
<b>AREB-2</b>	Citopenia 5 a 19% blastos Corpos de <i>Auer</i> Monócitos <1x10 <sup>9</sup> /L	Displasia uni ou multilinha 10 a 19% blastos Corpos de <i>Auer</i>
<b>SMD-i</b>	Citopenia <1% blastos	Displasia inequívoca em <10% das células de uma ou mais linhas mielóides associadas a alterações citogenéticas típicas da SMD <5% blastos
<b>SMD del(5q)</b>	Anemia Plaquetas normais ou elevadas Poucos blastos (<1%)	Megacariócitos em valores normais ou elevados <5% blastos Sem corpos de <i>Auer</i> Del(5q) é a única alteração citogenética

Associado ao sistema de classificação, o International Prognostic Scoring System (IPSS) é também usado na avaliação clínica (62). O IPSS integra a percentagem de blastos na MO, anomalias citogenéticas e o número de citopenias no SP, de forma a estratificar os doentes em subgrupos distintos que prevêm a taxa sobrevivência e o risco de progressão para LMA. O primeiro sistema de pontuação foi proposto em 1997 e considerava quatro graus de



risco: Baixo, Intermédio1, Intermédio2 e Alto. O grupo de Baixo risco era o que apresentava melhor prognóstico: a percentagem de blastos era inferior a 5%, o cariótipo normal ou com alterações isoladas e apenas uma ou ausência de citopenia. A taxa de sobrevivência era de aproximadamente 5 anos e a média de progressão para LMA de 9 anos. O grupo de risco Intermédio1 era predefinido pela presença de 5 a 10% de blastos e por duas a três citopenias. Neste grupo a taxa de sobrevivência era de 3 a 4 anos e a média de progressão para LMA de 3 anos. O grupo Intermédio2 definia-se pela presença de um cariótipo com alterações no cromossoma 7 ou com mais de três alterações cromossómicas. A taxa de sobrevivência era de apenas 1 ano e dois meses e a progressão para LMA de 1 ano. Finalizando, o grupo de Alto risco apresentava uma percentagem de blastos entre 21 a 30%, uma taxa de sobrevivência de 4 meses e uma média de progressão para LMA de 2 meses (62).

O sistema supra mencionado apresentava diversas limitações: o mesmo foi validado apenas para adultos com manifestações primárias da SMD, não considerava a severidade das citopenias e descrevia o cariótipo de forma muito limitada (63). Em 2012, o IPSS foi revisto (IPSS-R) tendo como base uma análise de 7000 doentes de mais de 10 países (64). O novo sistema subdivide os doentes com SMD em cinco subgrupos consoante os fatores de prognóstico: (I) Muito Baixo, (II) Baixo, (III) Intermédio, (IV) Bom e (V) Muito Bom. O grupo de pior prognóstico (I) Muito Baixo é dado por um cariótipo extremamente complexo com mais de 3 alterações genéticas, uma média de 7 meses de sobrevivência e de progressão para LMA (63,64). O grupo (II) Baixo inclui cariótipos como (-7) (ausência do cromossoma 7), alterações duplas (-7)/del(17q) e cariótipos complexos com mais de três alterações. A taxa de sobrevivência é de 1 ano e meio e a progressão para LMA de 1 ano e 7 meses. No subgrupo (III) Intermédio é característico um cariótipo de trissomia 8 ou 19 e/ou del(7q). A taxa de sobrevivência é de 2 anos e 7 meses e a progressão para LMA de 2 anos e 5 meses. Este subgrupo define-se por 5 a 10% de blastos, uma hemoglobina inferior a 8g/dL e uma contagem de plaquetas inferior a  $50 \times 10^9/L$ . O prognóstico (IV) Bom é dado por um cariótipo normal ou del(5q), deleção do braço curto do cromossoma del(12p), del(20q) ou outra anomalia. A taxa de sobrevivência é de 4 a 5 anos e o risco de progressão para LMA de 9 anos. A percentagem de blastos oscila entre 2 e 5%, a hemoglobina entre 8 e 10 g/dL, a contagem absoluta de neutrófilos deve ser inferior a  $0,8 \times 10^9/L$  e a contagem de plaquetas de 50 a  $100 \times 10^9/L$ . O grupo com prognóstico (V) Muito Bom é identificável por um cariótipo com del(11q) e ausência do cromossoma Y bem como, uma taxa de sobrevivência de

aproximadamente 5 anos. Neste subgrupo a percentagem de blastos é inferior a 2%, a hemoglobina superior a 10 g/dL, a contagem absoluta de neutrófilos superior ou igual a  $0,8 \times 10^9/L$  e a contagem de plaquetas superior a  $100 \times 10^9/L$ . Este sistema de classificação encontra-se resumido na Tabela 2. Apesar destas melhorias, o IPSS-R mantém-se válido para doentes com SMD *de novo* no momento do diagnóstico. Além disso, outras variáveis importantes no prognóstico, tais como, a presença de comorbilidades e a evolução clonal não são contabilizados por este sistema (63).

Tabela 2-Estratificação prognóstica da SMD proposta pelo IPSS, em 2012. Adaptado de (64).

Classificação IPSS-R (2012)							
Grupo de Risco	Cariótipo	Blastos na MO (%)	Hemoglobina (g/dL)	Contagem de neutrófilos ( $\times 10^9/L$ )	Contagem de plaquetas ( $\times 10^9/L$ )	Taxa de sobrevivência (anos)	Tempo de progressão para LMA (anos)
<b>Muito Bom</b>	Del(11q), (-Y)	<2	$\geq 10$	$\geq 0,8$	>100	5,4	-
<b>Bom</b>	Normal, del(5q), del(12p) del(20q)	2-<5	8-<10	<0,8	50-100	4,8	9,4
<b>Intermédio</b>	(+8),(+19), del(7q)	5-10	<8	-	<50	2,7	2,5
<b>Baixo</b>	(-7), alterações duplas incluindo(-7)/del(7q), complexo com> 3 alterações	>10	-	-	-	1,5	1,7
<b>Muito Baixo</b>	Complexo com> 3 alterações	-	-	-	-	0,7	0,7

#### 4.2-Critérios de Diagnóstico

Os sintomas frequentemente denotados pelos doentes consistem em fadiga, diminuição das atividades do quotidiano, infeções recorrentes, hemorragias e hematomas inexplicados. Estes sintomas correspondem a um quadro clínico de anemia, neutropenia e trombocitopenia, característico da SMD, no entanto, alguns dos doentes podem permanecer assintomáticos (65). Os doentes com SMD precoce são mais dificilmente diagnosticáveis uma vez que, apresentam menor risco de displasia e são mais propensos a apresentarem

citogenéticas normais. Assim, o diagnóstico deve ser o mais rigoroso e adequado possível (58).

O diagnóstico diferencial desta patologia exclui deficiências em micronutrientes e carências vitamínicas, como o caso da vitamina B<sub>12</sub> (66). As carências vitamínicas podem induzir uma maturação megaloblástica e displasia relativa. O diagnóstico diferencial deve, ainda, descartar infecções, como o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), alcoolismo e o efeito de drogas, estas causas podem estar subjacente a hipoplasia eritróide, maturação megaloblástica eritróide e displasia marcada. São ainda descartadas para o diagnóstico diferencial as doenças autoimunes, as doenças congénitas, a anemia aplásica, síndromes hereditárias, síndrome de *Down* e anemias congénitas. Estas condições patológicas podem estar na origem de eritropoiese inefetiva, aumento do *turnover* celular e hemoglobinopatias (66).

Para o diagnóstico são necessários pré-requisitos, nomeadamente: (a) citopenia marcada e constante ( $\geq 6$  meses a não ser que estudos citogenéticos revelem alterações típicas da SMD) em, pelo menos, uma das seguintes linhas hematopoiéticas: linha eritróide ( $<10\text{g/dL}$ ), linha granulocítica ( $<1,8 \times 10^9/\text{L}$ ), plaquetas ( $<100 \times 10^9/\text{L}$ ); (b) exclusão de doença hematopoiética clonal ou não clonal ou doença não hematopoiética que possa ser a causa de citopenia e/ou displasia (67). Além disso, para a confirmação do diagnóstico, deve ser considerado pelo menos um dos seguintes critérios de decisão: (i) displasia morfológica em pelo menos 10% de todas as células do esfregaço de MO em uma ou mais das seguintes linhas celulares: (a) eritróide ( $>15\%$  sideroblastos em anel também conta com critério de displasia), (b) linha granulocítica e seus precursores, (c) linha megacariocítica; (ii) contagem constante de blastos de entre 5 a 19%; (iii) anomalias citogenéticas típicas (que ocorrem frequentemente em SMD. Em doentes com “sub diagnóstico” ou resultados questionáveis em (i-iii) (a título de exemplo, alterações cromossómicas atípicas, displasia em  $<10\%$  das células, 4% de blastos, entre outras) mas com outras características clínicas relacionadas com a SMD (como por exemplo, anemia macrocítica dependente de transfusão), deverão ser realizados testes adicionais para se concluir sobre a existência de uma neoplasia mielóide clonal com falha medular. Nos critérios mínimos de diagnóstico, o International/European Leukemia Net Working Group, em 2014, sugeriu a análise de aspirados medulares por citometria de fluxo como co-critério para SMD (67,68).

## **Capítulo 5-Citometria de Fluxo no apoio ao diagnóstico da Síndrome Mielodisplásica**

### **5.1-Abordagem à Citometria**

A técnica de Citometria de Fluxo (CMF) convencional consiste na passagem de uma suspensão de células previamente marcadas com anticorpos monoclonais associados a fluorocromos, de uma única amostra, em frente a um ou vários raios laser. Cada célula suspensa passa através do feixe e dispersa a luz mediante a sua informação intrínseca. Os dados de cada célula são processados em diferentes momentos: quando a luz do laser muda de direção – Forward Scatter (FSC) e Sideward Scatter (SSC) e quando o laser atinge a célula em movimento, originando emissão fluorescente que permitirá visualizar uma cor (69). A quantidade de emissões de luz e de fluorescência dispersas dependem diretamente das características físicas de cada célula e da presença de fluorocromos naturais ou artificiais ligados, respetivamente. Dependendo do número de detetores de dispersão de luz e de fluorescência, da configuração ótica do instrumento, bem como, da especificidade dos reagentes utilizados para corar as células, poderão ser geradas e medidas entre três a dez diferentes emissões de fluorescência para cada evento celular. Com recurso a conjuntos adequados de filtros e espelhos dicróicos, a luz proveniente de emissões com diferentes comprimentos de onda é orientada de forma a alcançar diferentes detetores. Os sinais luminosos gerados pelos detetores são convertidos em sinais elétricos que, por sua vez, são transformados em dados eletrónicos (70,71). O processo torna-se facilmente perceptível através da análise da Figura 2. Em suma um citómetro é, em essência, um aparelho que capta luz que muda de direção e de cor. A mudança de direção da luz informa de maneira aproximada o tamanho da célula e a complexidade do seu citoplasma (se é granular ou não, por exemplo). A mudança de cor deve-se ao fluorocromo acoplado ao anticorpo que foi adicionado. Cada anticorpo do painel tem um único fluorocromo associado e este, por sua vez, não pode estar acoplado a nenhum outro anticorpo na mesma combinação utilizada (72).

### **5.2-Identificação de populações celulares na medula óssea**

A hematopoiese é um processo complexo no qual vários produtos de genes são expressos em células da MO em diferentes estadios de diferenciação. A CMF multiparamétrica é um excelente método para identificar padrões de expressão de antígenos

ao longo da maturação celular devido à utilização de anticorpos monoclonais que permitem medir os níveis de expressão de proteínas de superfície e citoplasmáticas (73).

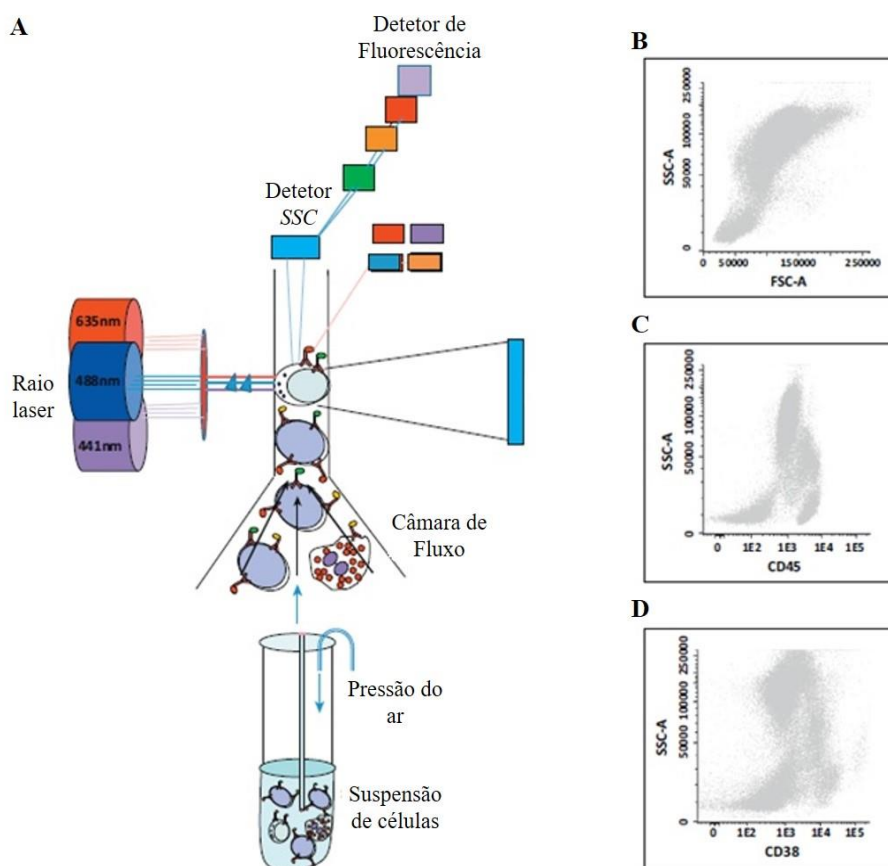


Figura 2-(A) Representação esquemática da geração de dados através da técnica de citometria de fluxo. As células provenientes de uma suspensão são aspiradas através de uma câmara de fluxo de forma a passarem uma por uma em frente a três raios laser. O sinal digital gerado pela quantidade de luz que atinge os diferentes detectores é processado por um computador equipado com software dedicado à análise de dados. (B) Representação gráfica em 2D dos pontos de dados correspondentes à passagem de cada célula: FSC vs SSC (C) SSC vs CD45 (D) SSC vs CD38. Adaptado de (72).

Verifica-se um consenso na literatura para o uso da expressão de CD45 e de SSC como o principal método para distinguir as linhas hematopoiéticas maioritárias. Linfócitos maduros são identificados como as células com maior expressão de CD45 e menor SSC e FSC (74,75). Os linfócitos T maduros estão confinados nesta população. Estas células expressam CD3 bem como CD2 e CD5 e podem ser subdivididas nas populações principais T CD4 e T CD8. Similarmente, as células *Natural Killer* são identificadas pela elevada expressão de CD16 e CD56, mas não expressam CD3. Os linfócitos B expressam CD19 e CD20 e, linfócitos B que expressem baixos níveis de CD10 representam o último estadio de maturação. Monócitos maduros expressam normalmente a mesma quantidade de CD45 que os linfócitos porém, são facilmente distinguidos por apresentarem maior granulosidade.

Estas células também expressam CD14, CD33, CD11b e HLA-DR. Os marcadores linfóides (CD19, CD3 e CD56) estão ausentes nesta população. A linha a neutrófilo pode ser subdividida em 4 principais estádios de maturação baseado na expressão de CD13 e CD11b: mieloblastos, promielócitos, mielócitos e metamielócitos, neutrófilos em banda e maduros. As células mais maduras têm maior expressão de CD45. Os neutrófilos expressam elevados níveis de CD11b, CD15 e CD16 sendo distinguidos dos monócitos pela menor expressão de CD33, CD64 e pela ausência de expressão de HLA-DR e CD14. Estes não apresentam antígenos linfóides (CD19 e CD3). As células comprometidas à linha eritróide apresentam baixa expressão ou mesmo ausência de CD45, ausência de antígenos linfóides e mielóides e elevada expressão de CD71 (74,75). A população de basófilos encontra-se na região dos precursores hematopoiéticos (CD34<sup>+</sup>) sendo a mesma identificada pela ausência de CD117 e HLA-DR e pela elevada expressão de CD123. Os eosinófilos, tal como os neutrófilos, são granulócitos e, como tal, apresentam SSC elevado e superior ao dos neutrófilos. Esta população é positiva para CD45. Os mastócitos são facilmente identificáveis pela elevada expressão de CD117, sendo a população celular que mais expressa este recetor celular. Por fim as células dendríticas plasmacitóides apresentam elevada expressão de CD123 e HLA-DR e expressão de CD45 idêntica à dos monócitos. Algumas das populações celulares referidas estão identificadas na Figura 3 (67,76).

## **5.2-Principais alterações na Síndrome Mielodisplásica**

A expressão de antígenos, em condições normais, não é modificada pela idade, alterações medulares ou transplantes de células estaminais. Em contraste, os processos neoplásicos raramente apresentam as características de expressão de antígenos das condições normais. Antígenos de superfície celular são, na sua maioria, produtos específicos de genes. O desenvolvimento de células sanguíneas pode ser modelado como um processo gradual em que, cada estádio é delineado por múltiplas alterações na expressão do produto do gene. O tempo, a quantidade e a regulação coordenada dos produtos dos genes são cruciais para assegurar números suficientes de células em circulação. Em neoplasias, como a SMD, a sincronização e regulação da expressão de genes é alterada em diferentes graus, o que permite a progressão da doença e perda de regulação (77–79).

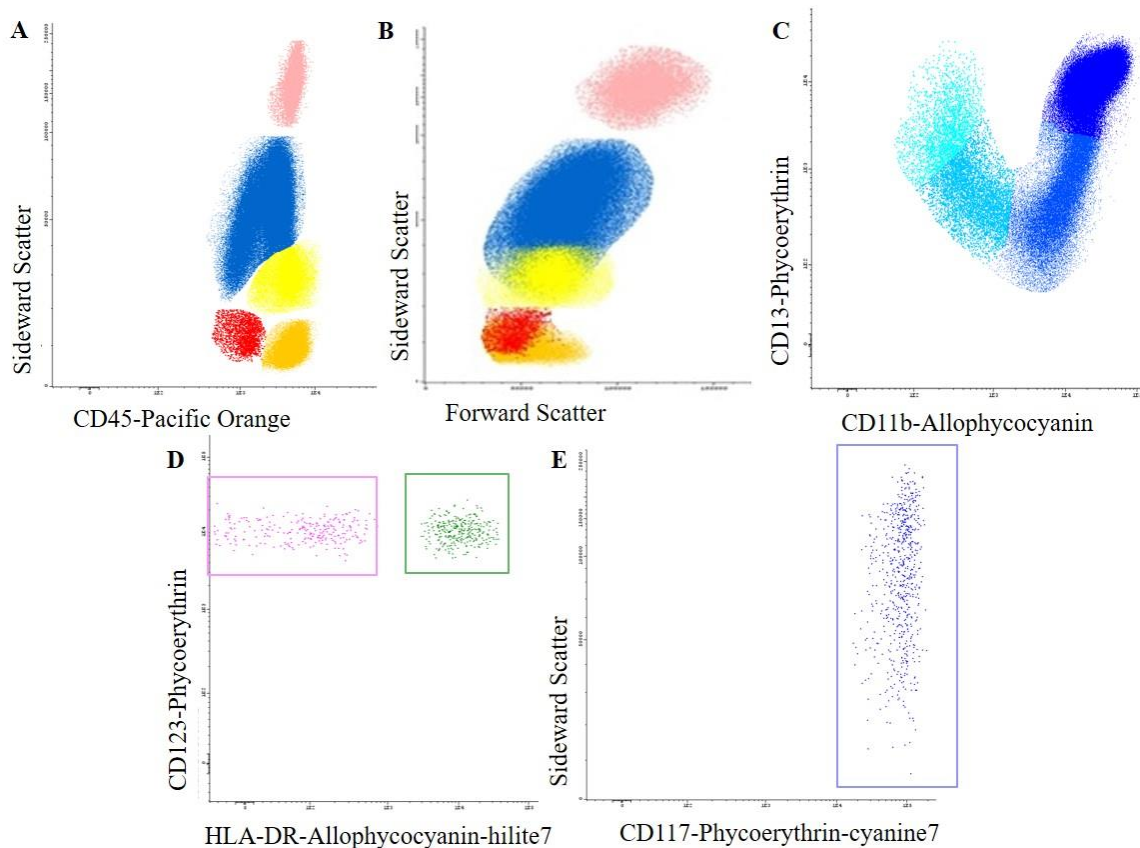


Figura 3-Dot plot bidimensional que ilustra as diferentes populações celulares identificáveis por citometria de fluxo, numa MO normal. (A) Identificação das populações celulares com base na expressão de CD45 e (B) Identificação das mesmas populações celulares de acordo com o tamanho e complexidade: a rosa os eosinófilos; a azul os neutrófilos, a amarelo os monócitos, a laranja os linfócitos, a vermelho os precursores hematopoiéticos CD34<sup>+</sup>; (C) Identificação dos estadios de maturação na linha a neutrófilo com base na expressão de CD13 e CD11b: a azul-ciano os mieloblastos, a azul-turquesa os promielócitos, a azul os mielócitos e metamielócitos e a azul-escuro os neutrófilos em banda e maduros; (D) Identificação das populações celulares de basófilos e células dendríticas plasmacitóides com base na expressão de CD123 e HLA-DR: a rosa os basófilos, a verde as células dendríticas plasmacitóides; (E) Identificação da população de mastócitos com base na expressão de CD117.

O foco da citometria de fluxo, em SMD, incide especialmente nas linhas hematopoiéticas maioritárias, nomeadamente na linha granulocítica, monocítica e eritróide e no compartimento CD34<sup>+</sup>. É de referir que estas linhas hematopoiéticas, para além de serem as mais representadas celularmente, são as linhas cuja hematopoiese foi numerosamente estudada e, como tal, se encontra melhor descrita (67). O compartimento CD34<sup>+</sup>, em SMD, encontra-se frequentemente aumentado em percentagem celular na celularidade global da MO. Fenotipicamente, verifica-se que os precursores CD34<sup>+</sup>

expressam CD5, CD7, CD11b, CD15, CD19, CD56 e ausência de expressão de CD13, CD33 e/ou HLA-DR. A mesma pode apresentar diminuição na expressão de CD38 e CD45, bem como, intensidade anormal na expressão de CD34 (80). A linha granulocítica/neutrófilo apresenta, em SMD, diminuição da granulosidade, diminuição na expressão de CD11b, CD15, CD16 e CD64. Nesta linha hematopoiética poderá ocorrer aumento de expressão de CD13, expressão alterada de CD33 e ausência de expressão de CD10 nas células maduras. Na linha monocítica observa-se, em SMD, aumento na percentagem de monócitos na celularidade global da MO, expressão alterada dos recetores celulares CD13 e CD56. Observa-se, ainda, aumento da expressão de CD64 e ausência de expressão de CD14 e CD33 (81,82). Na linha eritróide, em SMD, é frequente uma diminuição na expressão de CD71 e Glicoporina A e um aumento na expressão de CD105 e CyH-Ferritina (83). Estas alterações estão evidenciadas na Tabela 3. Assim, verifica-se um número crescente de estudos que demonstram múltiplas e variáveis alterações imunofenotípicas em SMD que podem potencialmente contribuir para o diagnóstico e avaliação prognóstica da patologia (84).

Tabela 3-Alterações celulares e imunofenotípicas frequentemente identificadas em SMD, no compartimento CD34<sup>+</sup> e nas linhas granulocítica/neutrófilo, monocítica e eritróide. Adaptado de (80–83).

<b>Alterações celulares e imunofenotípicas detetadas por CMF</b>			
<b>Compartimento CD34<sup>+</sup></b>	<b>Linha granulocítica/neutrófilo</b>	<b>Linha monocítica</b>	<b>Linha eritróide</b>
Aumento na percentagem celular	Diminuição da granulosidade	Aumento na percentagem celular	Diminuição na expressão de CD71
Expressão de CD5, CD7, CD11b, CD15, CD19 e/ou CD56	Aumento da expressão de CD13	Expressão alterada de CD13	Diminuição na expressão de Glicoporina A
Ausência de expressão de CD13, CD33 e HLA-DR	Ausência de expressão de CD10 na célula madura	Aumento de expressão de CD64	Aumento de expressão de CD105
Diminuição de expressão de CD38 e de CD45	Expressão alterada de CD33	Expressão aberrante de CD56	Aumento de expressão de CyH-Ferritina
Alteração na expressão de CD34 (aumentada/diminuída)	Diminuição na expressão de CD11b, CD15, CD16 e CD64	Ausência de expressão de CD14 ou CD33	



## **Capítulo 6-Estratégias Terapêuticas**

A estratégia terapêutica é definida de acordo com o risco calculado, a percentagem de blastos, o perfil genético/mutacional e a clínica sendo dominada pelas necessidades transfusionais. Apesar de algumas limitações, o IPSS continua a ser o índice utilizado na estratificação dos doentes para definição da abordagem terapêutica, dividindo os doentes em dois grupos: baixo risco (IPSS de Baixo risco e Intermédio<sup>1</sup>) e alto risco (IPSS Intermédio<sup>2</sup> e Alto risco). Para além disso, também as características intrínsecas do próprio doente, nomeadamente idade e estado funcional, deverão ser tidas em conta (62,85).

A apresentação clínica da SMD de baixo risco é, habitualmente, dominada por anemia que constitui o principal fator de morbilidade (85,86). A lenalidomida, um agente imunomodulador, mostrou apresentar melhoria da anemia em cerca de 60% dos casos da SMD associada a del(5q) com anemia dependente de transfusão, assim como melhoria das contagens plaquetares e de granulócitos. Este fármaco induziu resposta citogenética competente (normalização do cariótipo em cerca de 50% dos casos) (86,87). O factor de estimulação de colónias de granulócitos apresentou benefícios não só nos doentes com neutropenia mas também evidenciou uma melhoria na anemia, mostrando um efeito sinérgico com a eritropoetina. Apesar de ainda não estar completamente esclarecido, o mecanismo parece estar relacionado com a diminuição dos progenitores apoptóticos na MO (88,89). A terapêutica imunossupressora com administração de ciclosporina e/ou globulina anti-timócito, essencialmente dirigida aos linfócitos T potencialmente reativos (sobretudo nos doentes com trissomia do cromossoma 8) assim como os agonistas do receptor da trombopoetina mostraram induzir resposta em alguns doentes com trombocitopenia (90).

Os doentes que apesar de manterem critérios da SMD de baixo risco, apresentarem citopenias graves, critérios de mau prognóstico ou refratariedade à terapêutica deverão ser equacionados para abordagens mais intensivas, comuns à SMD de alto risco, inclusive transplante de progenitores hematopoiéticos (91). Os doentes classificados como alto risco apresentam prognóstico reservado e taxas de sobrevivência limitadas. O objetivo assenta na alteração do curso natural da doença, com melhoria da sintomatologia e prolongamento da sobrevivência (92). A terapêutica dos doentes com SMD de alto risco baseia-se sobretudo nos agentes hipometilantes como a azacitidina e a decitabina. Estes fármacos devem ser usados por um mínimo de 6 ciclos e manter-se o seu tratamento enquanto existir resposta, uma vez que, opções terapêuticas adicionais são escassas (91). A descoberta dos agentes

hipometilantes teve um impacto significativo na qualidade de vida e sobrevivência. O mecanismo responsável pela eficácia destes agentes continua a ser controverso: a sua atividade poderá induzir hipometilação no ADN e/ou modular o sistema imune (93). O transplante de progenitores hematopoiéticos deverá ser equacionado em doentes com citopenias refratárias à terapêutica, com menos de 70 anos e boa *performance* de status (94). Durante o período de procura de dador compatível ou ausência deste ou nos subtipos associados a excesso de blastos, poderá ser efetuada quimioterapia intensiva, cuja durabilidade se revelou inferior à dos doentes com leucemia aguda, assim como terapêutica de manutenção com os agentes alquilantes (95).

Apesar de cada vez mais se caminhar para a definição de *guidelines* universalmente aceites, as orientações terapêuticas na SMD ainda permanecem controversas. A prescrição é dinâmica e poderá ser alterada no decurso da evolução da doença, quer esta passe a integrar um grupo de risco diferente e em função da resposta à terapêutica. A pesquisa de novas alterações genéticas e epigenéticas bem como o desenvolvimento de melhores sistemas de prognóstico são essenciais para alterar o paradigma subjacente ao tratamento da SMD assim como o seu prognóstico (92).

## **Objetivo**

---



## Capítulo 7-Objetivo

A Síndrome Mielodisplásica é caracterizada por heterogeneidade clínico-biológica e, apesar dos esforços da Organização Mundial de Saúde e do International Prognostic Scoring System para estratificar os doentes em grupos homogêneos, esta continua a observar-se.

O International/European Leukemia Net Working Group recomendou em 2014 a integração da técnica de citometria de fluxo no apoio ao diagnóstico da SMD. Nos últimos anos, a citometria de fluxo incidiu no estudo das linhas hematopoiéticas maioritárias da MO nomeadamente, na linha granulocítica, monocítica e eritróide bem como no compartimento CD34<sup>+</sup>.

Posto isto, o objetivo deste trabalho incidiu no estudo fenotípico e funcional das linhas minoritárias da MO, mais concretamente, da linha a basófilo, eosinófilo, célula dendrítica plasmacitóide e a mastócito. Assim, pretendeu-se avaliar o eventual contributo da caracterização fenotípica das linhas hematopoiéticas minoritárias da MO no diagnóstico da SMD.

Para este efeito:

- 1) Estudaram-se, retrospectivamente, 84 amostras com SMD ao momento do diagnóstico e compararam-se com 14 amostras normais/reativas de forma a identificar possíveis bloqueios maturativos, bem como, analisar a expressão de diferentes recetores celulares relevantes na maturação das linhas hematopoiéticas em estudo, tais como: CD10, CD11B, CD13, CD33, CD34, CD35, CD44, CD45, CD64, CD117, CD123, CD133 e HLA-DR.
- 2) Realizou-se expressão génica para os genes *Triptase* e *Peroxidase do Eosinófilo*, com o intuito de identificar alterações funcionais na população de basófilos e eosinófilos, respetivamente. Este estudo foi realizado 9 amostras de MO com SMD e 5 normais/reativas.



# **Materiais e Métodos**





## Capítulo 8-Materiais e Métodos

### 8.1-Caraterização Imunofenotípica

#### 8.1.1-População em estudo

O estudo imunofenotípico consistiu num estudo retrospectivo que integrou a análise de 84 aspirados medulares de doentes diagnosticados com SMD sem serem sujeitos a tratamento (52 % do sexo feminino e 48% do sexo masculino com uma média de idades de  $69\pm 11$ anos). De acordo com os critérios propostos pela OMS (2008), os doentes foram classificados como: CRDU, 8 casos; CRDM, 45; AREB-1, 17; AREB-2, 14 casos (Tabela 4). Segundo o IPSS (1997), apenas 53 dos casos foram passíveis de estratificar (59% do sexo feminino e 41% do sexo masculino com uma média de idades de  $72\pm 10$  anos), 18 casos foram classificados como de Baixo risco, 19 como de risco Intermédio1 (Int1) e 16 agrupados em Intermédio2-Alto risco (Int2-Alto) (Tabela 4).

O estudo integrou, também, 14 aspirados medulares normais/reativos, sem doenças hematológicas clonais, sem citopenias e sem rasgos displásicos observados por morfologia (71% do sexo feminino e 29% do sexo masculino com uma média de idades de  $61\pm 14$  anos), que foi designado como grupo Controlo. Os doentes foram diagnosticados no Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e no Centro Hospitalar Tondela Viseu. O estudo foi aprovado pelo comité de ética local e os participantes assinaram um consentimento informado.

Tabela 4-Caraterização clínica (sexo e média de idades) dos diferentes grupos da SMD que integraram o estudo retrospectivo, de acordo com a classificação OMS (2008) e IPSS (1997).

OMS	Sexo Feminino (%)	Sexo Masculino (%)	Idade (média $\pm$ desvio padrão)
<b>Grupo Controlo (n=14)</b>	71	29	$61\pm 14$
<b>SMD (n=84)</b>	52	48	$70\pm 12$
<b>CRDU (n=8)</b>	62	38	$74\pm 13$
<b>CRDM (n=45)</b>	53	47	$68\pm 12$
<b>AREB-1 (n=17)</b>	59	41	$75\pm 8$
<b>AREB-2 (n=14)</b>	36	64	$69\pm 16$
<b>IPSS</b>			
<b>SMD (n=53)</b>	59	41	$72\pm 10$
<b>Baixo (n=18)</b>	56	44	$68\pm 12$
<b>Int1 (n=19)</b>	69	31	$75\pm 9$
<b>Int2-Alto (n=16)</b>	50	50	$73\pm 8$

Para cada amostra de aspirado medular com anticoagulante EDTA foram realizados quatro tubos de oito fluorescências sendo que, 3 dos tubos integravam o painel LMA/SMD proposto pelo consórcio Euroflow (96). A combinação das fluorescências dos anticorpos monoclonais e a sua especificidade bem como, a fonte comercial de cada reagente encontra-se representado na Tabela 5. Os anticorpos monoclonais foram adicionados a 100µL de aspirado medular (em cada tubo) e procedeu-se à incubação (10 minutos em ausência de luz e à temperatura ambiente). As amostras foram lisadas com 2mL de *FACS Lysing Solution* (BD) e após nova incubação (10 minutos em ausência de luz e à temperatura ambiente), foram centrifugadas a 1500G durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet, contendo as células de interesse, lavado com 2 mL de solução salina de fosfato (*PBS, Gibco, Life Technologies, Paisley, UK*) e, por fim, ressuspenso em 500µL de *PBS*. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo *FACSCanto™ II* (BD Biosciences; San José, CA, USA) com o *software FACS Diva* (v6.1.2; BD). A análise dos dados foi realizada com recurso ao *software Infinicyt 1.7* (Cytognos, Salamanca, Spain).

Tabela 5-Combinação dos anticorpos monoclonais em oito fluorescências e respetiva especificidade e fonte comercial do reagente para os tubos em estudo. Os tubos assinalados com \* integram o painel LMA/SMD de 8 cores proposto pelo consórcio Euroflow (95).

Fluorescências	Tubo 1*	Tubo 2*	Tubo 3*	Tubo 4
<b>APC</b> (Allophycocyanin)	CD11b (clone D12, BD Biosciences, USA)	IREM2 (clone UP-H2, Bioscience, USA)	CD33 (clone P67,6 BD Biosciences, USA)	CD133 (clone 293C3, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany)
<b>APC H7</b> (Allophycocyanin-hilite 7)	CD10 (clone HI10a, BD Biosciences, USA)	CD14 (clone MΦP9, BD Biosciences, USA)	CD71 (M-A712, BD Biosciences, USA)	HLA-DR (clone L243, BD Biosciences, USA)
<b>FITC</b> (Fluorescein isothiocyanate)	CD16 (clone 3G8, Beckman Coulter, USA)	CD35 (clone E11, BD Biosciences, USA)	CD36 (clone FA6,152, Beckman Coulter, USA)	CD35 (clone E11, BD Biosciences, USA)
<b>PB</b> (Pacific Blue)	HLA-DR (clone L234, BD Biosciences, USA)	HLA-DR (clone L234, BD Biosciences, USA)	HLA-DR (clone L234, BD Biosciences, USA)	CD44 (clone L234, BD Biosciences, USA)
<b>PE</b> (Phycoerythrin)	CD13 (clone L138, BD Biosciences, USA)	CD64 (clone 22, Beckman Coulter, USA)	CD105 (1G2, Beckman Coulter, USA)	CD123 (clone 9F5, BD Biosciences, USA)
<b>PE Cy7</b> (Phycoerythrin-cyanine 7)	CD117 (clone 104D2D1, Beckman Coulter, USA)	CD117 (clone 104D2D1, Beckman Coulter, USA)	CD117 (clone 104D2D1, Beckman Coulter, USA)	CD117 (clone 104D2D1, Beckman Coulter, USA)
<b>PerCp Cy 5.5</b> (Peridinin chlorophyll protein-cyanine 5.5)	CD34 (clone 8G12, BD Biosciences, USA)	CD34 (clone 8G12, BD Biosciences, USA)	CD34 (clone 8G12, BD Biosciences, USA)	CD34 (clone 8G12, BD Biosciences, USA)
<b>PO</b> (Pacific Orange)	CD45 (clone H130, BD Biosciences, USA)	CD45 (clone H130, BD Biosciences, USA)	CD45 (clone H130, BD Biosciences, USA)	CD45 (clone H130, BD Biosciences, USA)

### 8.1.2-Caraterização da linha a basófilo, eosinófilo, célula dendrítica plasmacitóide e mastócito

Na linha a basófilo, consideraram-se dois estadios maturativos (estadio I e II, estadio III). Os estadios foram definidos com base na expressão de CD13 vs CD11b (Tubo1), CD45 vs CD35 (Tubo2), CD45 vs CD33 (Tubo3) e CD123 vs CD35 (Tubo4) (Fig.4 A-D). Assim, os estadios foram definidos por: estadio I e II -  $CD11b^{ele}/CD13^{ele}/CD35^{bx}/CD33^{bx}/CD45^{ele}/CD123^{ele}$  e estadio III -  $CD11b^{bx}/CD13^{bx}/CD33^{ele}/CD35^{ele}/CD45^{ele}/CD123^{ele}$  (ele-elevado, int-intermédio e bx-baixo).

Para a linha a eosinófilo, consideraram-se três estadios maturativos (estadio I, estadio II, estadio III) com base na expressão de CD13 vs CD11b (Tubo1), CD64 vs CD35 (Tubo 2), CD71 vs CD33 (Tubo3) e CD35 vs CD44 (Tubo4) (Fig.4 E-H). Os estadios maturativos foram definidos como: estadio I -  $CD11b^{bx/int}/CD13^{ele/int}/CD33^{ele}/CD35^{ele}/CD44^{bx}/CD64^{ele}/CD71^{ele}$ ; estadio II -  $CD11b^{int}/CD13^{int}/CD33^{ele}/CD35^{ele}/CD44^{int}/CD64^{ele}/CD71^{ele}$ ; estadio III -  $CD11b^{ele}/CD13^{ele}/CD33^{int}/CD35^{int}/CD44^{ele}/CD64^{int}/CD71^{bx/int}$ .

Na linha a célula dendrítica plasmacitóide, considerou-se a população total e dois estadios maturativos (estadio I e II, estadio III). A população total foi identificada com base na expressão de CD123 vs HLA-DR e os estadios maturativos definidos pela expressão de CD117 vs HLA-DR (Tubo4): estadio I e II -  $CD117^{ele/int}/HLA-DR^{ele}$ ; estadio III -  $CD117^{int/bx}/HLA-DR^{int}$  (Fig.4 I-J).

Por último, na linha a mastócito considerou-se a população total, facilmente identificável pela elevada expressão de CD117 ( $CD117^{ele}$ ). Não foram considerados estadios maturativos (Fig.4 L).

### 8.1.3-Variáveis imunofenotípicas em estudo

Diferentes variáveis imunofenotípicas foram analisadas para cada amostra: (a) linha a basófilo: % total de basófilos na celularidade global da MO, % de células no estadio I e II, % de células no estadio III e a expressão dos recetores CD11b, CD13 (Tubo1), CD35 (Tubo2), CD33 (Tubo3) e CD44, CD45, CD123 (Tubo4); (b) linha a eosinófilo: % total de eosinófilos na celularidade global da MO, % de células no estadio I, % de células no estadio II, % de células no estadio III e a expressão dos recetores CD11b, CD13 (Tubo1), CD35,

CD64 (Tubo2) e CD44, CD45 (Tubo4); (c) linha a célula dendrítica plasmacitóide: % total de células dendrítica plasmacitóide na celularidade global da MO, % de células no estadio I e II, % de células no estadio III e para a população total a expressão de HLA-DR, CD44, CD123, CD45 (Tubo4), para os dois estadios maturativos a expressão de CD133, HLA-DR, CD44, CD123, CD34 e CD45 (Tubo4); (d) linha a mastócito: % total de mastócitos na celularidade global da MO e expressão dos recetores CD10, CD117, CD13 (Tubo1), CD35, HLA-DR (Tubo2), CD33 (Tubo3) e CD44, CD45, CD123 (Tubo4).

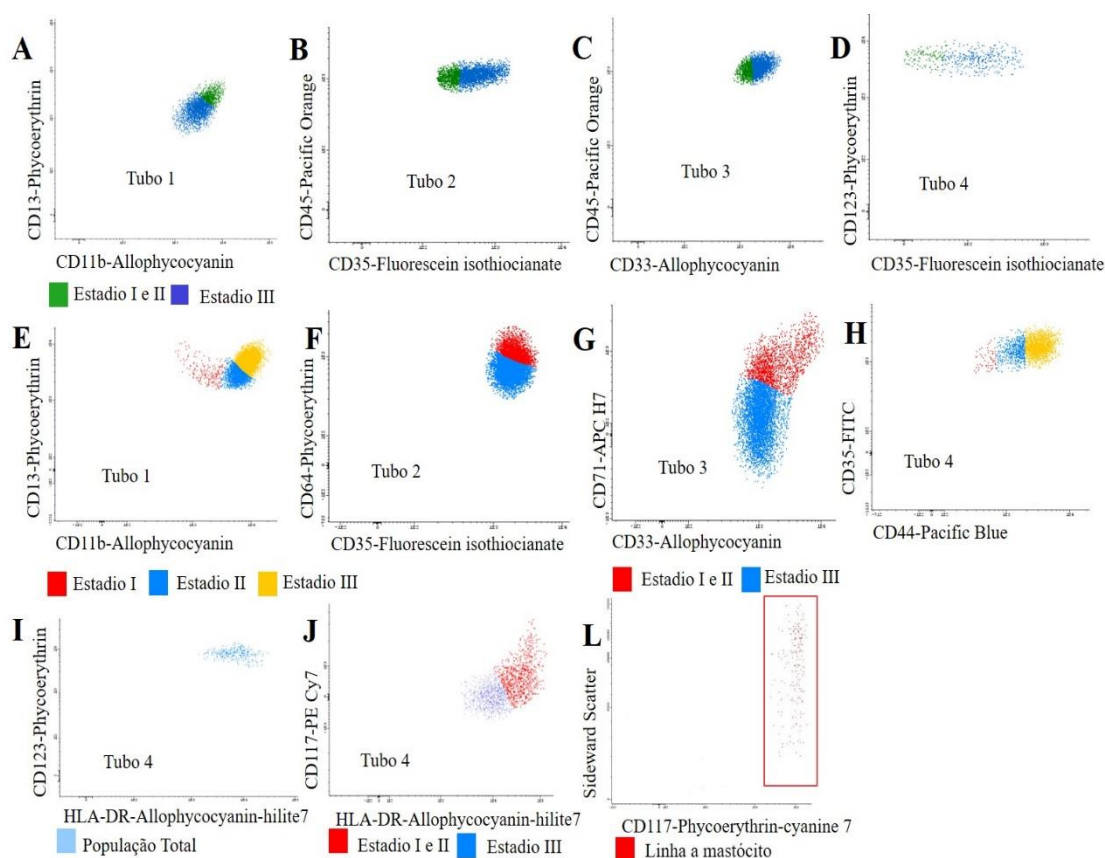


Figura 4-Dot plot bidimensional que ilustra os diferentes estadios maturativos das diferentes linhas hematopoiéticas em estudo numa MO normal (A-L). (A) CD13 vs CD11b, (B) CD45 vs CD35, (C) CD45 vs CD33, (D) CD123 vs CD35 para a identificação de dois estadios maturativos na linha a basófilo (E) CD13 vs CD11b, (F) CD64 vs CD35, para definir três estadios maturativos na linha a eosinófilo, (G) CD71 vs CD33, (H) CD35 vs CD44 para identificação de apenas dois estadios maturativos na linha a eosinófilo (estadio I e II agrupado) (I) CD123 vs HLA-DR para identificação da população total, (J) CD117 vs HLA-DR para definir dois estadios na linha a célula dendrítica plasmacitóide. (L) CD117<sup>ele</sup> para identificação da linha a mastócito.

#### 8.1.4-Análise Estatística

Para determinar o significado estatístico das diferenças observadas entre grupos realizou-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis complementado com o teste de Mann-Whitney, usando o *software Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, version 23.0,

Armonk, NY, USA). As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $p$  value <0,05 e, para todas as variáveis em estudo, calculou-se a média e o desvio-padrão.

## **8.2-Expressão dos genes *Triptase* e *Peroxidase* do Eosinófilo**

### **8.2.1-População em estudo**

A expressão génica realizou-se num pequeno número de amostras que incluiu 5 aspirados medulares normais/reativos, sem doenças hematológicas clonais, sem citopenias e sem traços displásicos observados por morfologia, designado de grupo Controlo (60% do sexo feminino e 40% do sexo masculino com uma média de idades  $69 \pm 17$  anos) e 9 doentes diagnosticados com SMD (67% do sexo feminino e 33% do sexo masculino com uma média de idades  $71 \pm 9$  anos).

### **8.2.2-Separação e purificação das populações celulares**

Para a separação de eosinófilos e basófilos, o aspirado medular (250µL) foi lisado com Cloreto de Amónio (NH<sub>4</sub>Cl) durante 20 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente procedeu-se a uma centrifugação a 1500G durante 5 minutos e, após descartar o sobrenadante, foram adicionados os seguintes anticorpos monoclonais com as respetivas fluorescências e especificidade: HLA-DR (clone L234, BD Biosciences, USA) Pacific Blue, CD117 (clone 104D2D1, Beckman Coulter, USA) Phycoerythrin-cyanine7, CD45 (clone H130, BD Biosciences, USA) Pacific Orange, CD13 (clone L138, BD Biosciences, USA) Phycoerythrin e CD123 (clone 9F5, BD Biosciences, USA) Allophycocyanin.

A estratégia de separação de eosinófilos consistiu nas características de FSC e SSC apresentadas por esta célula associada à sua positividade para CD45 e à autofluorescência visualizável no dot plot CD123 vs HLA-DR. Similarmente, para a separação de basófilos, conjugaram-se as suas características de FSC e SSC e a sua positividade para CD123, HLA-DR e CD45 (CD123<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>).

Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente na ausência de luz, as células foram lavadas e resuspensas com 1 mL de solução salina de fosfato (PBS, Gibco. Life Technologies, Paisley, UK) e procedeu-se à separação utilizando o separador celular *BD FACS Aria<sup>TM</sup> III* (BD Biosciences; San José, CA, USA). As populações celulares separadas foram centrifugadas durante 3min a 1500G e o pellet resuspenso em 350µL de tampão de lise RLT (Qiagen, Hilden, Germany).

### 8.2.3-Análise de expressão dos genes *Triptase* e *Peroxidase do Eosinófilo*

A extração de mRNA total foi realizada com o *RNeasy Micro Kit* (Quiagen, Germany) de acordo com as instruções do fornecedor. O mRNA foi transcrito reversamente, na sua totalidade, com o *KIT High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, USA) de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante. O gene de referência utilizado foi *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*, para os basófilos foi avaliada a expressão do gene *Triptase (TPS)* e para os eosinófilos o gene *Peroxidase do Eosinófilo (EPX)*. Os conjuntos de primers que permitiram a expressão dos genes supramencionados estão representados na Tabela 6.

A quantificação relativa da expressão gênica por PCR em tempo real (qRT-PCR) foi realizada no *Bio-Rad CFX Manager (CFX96 Real Time System C100 Thermal Cycler*, California). Para as reações de qRT-PCR utilizou-se 1X Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1X QuantiTect Primer Assay e Nuclease-free water prefazendo um total de 8 µL e 2µL de amostra de cDNA, sendo o volume total da reação de 10 µL. A reação de qRT-PCR está representada na Tabela 7.

Tabela 6-Conjunto de primers (Forward e Reverse) e temperaturas de annealing utilizadas para a expressão dos genes *GAPDH*, *TPS* e *EPX*.

Gene	Primers	Temperatura de Annealing (°C)
<i>GAPDH</i>	Forward 5'AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC3' Reverse 5'CAGAGTTAAAAGCAGCCCTGGT3'	60
<i>TPS</i>	Forward 5'GACTCATGCCAGGGCGACTC3' Reverse 5'TTTGGACAGCAGGGGTGGT3'	64
<i>EPX</i>	Forward 5'TGTATGAAGGGGGCATCGAC3' Reverse 5'TCCTCCTCACTTGCCGAAAC3'	62

Tabela 7-Esquema do perfil da reação de qRT-PCR utilizado para a expressão dos genes em estudo.

Etapa	Ativação da polimerase <i>AmpliTaq Gold</i>	PCR	
	Aquecimento	50 Ciclos	
		Desnaturação	Annealing/ Extensão
<b>Temperatura</b>	95°C	95°C	Dependente dos primers
<b>Tempo</b>	10 min	15 seg	1 min

Para cada gene foi estabelecida uma curva padrão através de diluições seriadas de modo a determinar a eficiência da reação. Complementarmente, foram realizadas curvas de melting para verificar a ausência de produtos inespecíficos. A normalização dos níveis de expressão dos genes de interesse foi calculada pelo método delta-Ct.

#### 8.2.4-Análise Estatística

Para determinar o significado estatístico das diferenças observadas entre grupos realizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, usando o *software Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, version 23.0, Armonk, NY, USA). As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando *p value* <0,05.





## **Resultados**

---



## Capítulo 9-Resultados

### 9.1-Caraterização Imunofenotípica

Na comparação imunofenotípica de MO diagnosticadas com SMD e de MO normais/ reativas não se observou qualquer diferença (estatisticamente significativa) nas percentagens celulares totais de cada linha hematopoiética, quando comparadas com o grupo Controlo, nem nas frequências celulares dos diferentes estadios maturativos. Assim, não se observaram bloqueios maturativos nas linhas hematopoiéticas em estudo. As alterações **estatisticamente significativas** mais frequentes, nos diferentes estadios maturativos e população total, consistiram no aumento da expressão de **CD44** e **CD45** nas diferentes linhas hematopoiéticas em estudo. Observou-se ainda uma diminuição da expressão de **CD13** na linha a basófilo e de **CD35** e **CD64** na linha a eosinófilo e um aumento na expressão de **CD117** e **HLA-DR** na linha a mastócito.

Na **linha a basófilo**, segundo a classificação OMS (2008), verificou-se um aumento na expressão de **CD44** nos grupos CRDU e CRDM quando comparados com o grupo Controlo para ambos os estadios. O grupo CRDU apresentou, ainda, aumento de expressão quando comparado aos grupos CRDM e AREB-1 para o estadio III e para os dois estadios considerados, respetivamente. No sistema IPSS (1997), o grupo de risco Intermédio1 apresentou aumento na expressão deste recetor quando comparado com o grupo Controlo, em ambos os estadios enquanto o grupo de Baixo risco apenas obteve diferença no estadio I e II. O aumento de expressão de **CD45**, para ambos os sistemas de classificação/pontuação, ocorreu em todos os grupos da SMD e em todos os estadios. Por fim, segundo a OMS (2008), observou-se diminuição na expressão de **CD13** no grupo CRDU quando comparado ao grupo Controlo. Na comparação dos grupos da SMD, a diminuição de expressão ocorreu nos grupos CRDU e CRDM quando comparados com AREB-1 e AREB-2. Segundo o sistema IPSS (1997), o grupo de Baixo risco apresentou diminuição da expressão de CD13 quando comparado com o grupo Controlo e com o grupo Intermédio2-Alto, no estadio III. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos recetores celulares: CD11b, CD33, CD35 e CD123. A Figura 5 e a Tabela 8 demonstram as alterações nesta linha hematopoiética.

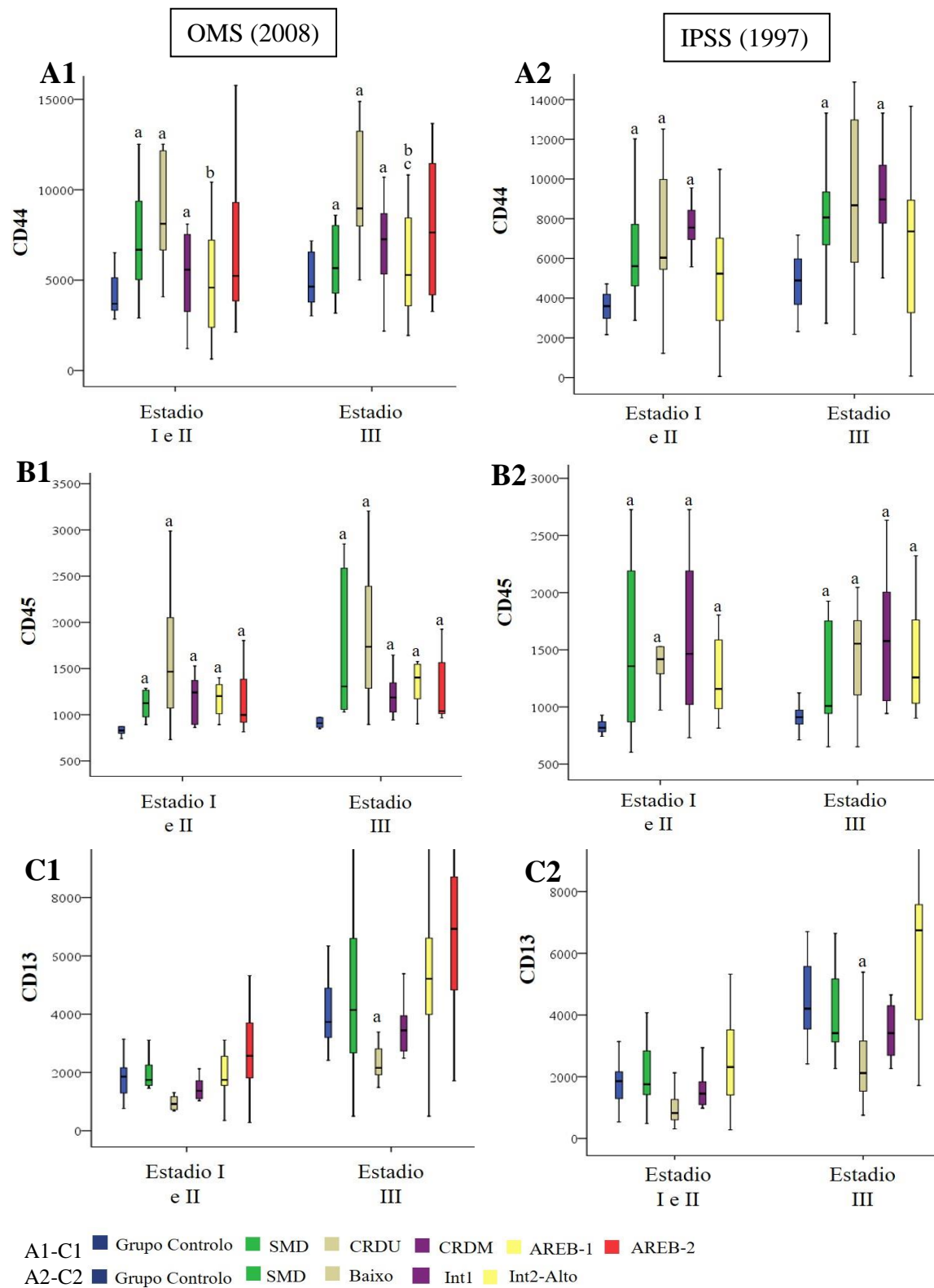


Figura 5-Gráficos de expressão de CD44, CD45 e CD13, dados pela média de intensidade de fluorescência (MIF), para a linha a basófilo e para os diferentes grupos da SMD mediante a classificação OMS (2008) e o sistema IPSS (1997). As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3º quartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança. Com significado estatístico para  $p < 0,05$  Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney: a) vs grupo Controle, b) vs CRDU, c) vs CRDM e d) vs Baixo risco. (A1-C1) Classificação OMS (2008); (A2-C2) Sistema IPSS (1997). (A) Expressão de CD44; (B) Expressão de CD45; (C) Expressão de CD13.

Tabela 8-Frequência das células da linha a basófilo na celularidade global da MO e percentagem dos estadios maturativos na frequência celular da linha a basófilo; expressão dos recetores celulares importantes na maturação da linha a basófilo, dado pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Dados obtidos em MO normais/reactivas (grupo Controlo) vs doentes diagnosticados com SMD e estratificados segndo a OMS (2008) e IPSS (1997).

		Grupo Controlo	SMD	OMS (2008)				IPSS (1997)		
				CRDU	CRDM	AREB-1	AREB-2	Baixo	Int1	Int2-Alto
%Basófilos		0,31 ±0,27	0,19 ±0,29	0,17 ±0,09	0,17 ±0,18	0,12 ±0,07	0,37 ±0,62	0,22 ±0,24	0,16 ±0,12	0,36 ±0,57
%Estadio I e II		30,62 ±7,84	32,67 ±8,45	35,24 ±7,89	33,46 ±8,69	31,01 ±7,21	30,66 ±9,56	35,11 ±6,37	35,75 ±8,44	29,65 ±8,79
%Estadio III		69,38 ±7,84	67,14 ±8,42	64,75 ±7,90	66,19 ±8,59	68,99 ±7,21	69,34 ±9,56	64,33 ±5,78	64,25 ±8,44	70,02 ±9,00
CD11b	I e II	2724 ±1622	2520 ±1971	2288 ±1466	2497 ±1845	2610 ±1821	2666 ±2959	2091 ±1097	2925 ±2361	2470 ±2767
	III	4569 ±2180	5037 ±4186	3814 ±2005	4725 ±3287	5780 ±4241	6094 ±7214	3702 ±1940	5319 ±4236	5604 ±6735
CD13	I e II	1895 ±800	1926 ±1500	1156 ±749	1801 ±1717	2056 ±815	2870 ±1563	1243 ±864	2124 ±2043	2571 ±1457
	III	4629 ±1588	5004 ±3827	<b>2898<sup>a</sup></b> <b>±2103</b>	4559 ±4183	<b>6331<sup>b,c</sup></b> <b>±3858</b>	<b>6640<sup>b,c</sup></b> <b>±2688</b>	<b>3389<sup>a</sup></b> <b>±2756</b>	5153 ±4844	<b>6193<sup>d</sup></b> <b>±2540</b>
CD33	I e II	2065 ±1492	2234 ±1720	1893 ±1181	2279 ±1334	2064 ±1707	2533 ±3099	1253 ±620	776 ±524	1426 ±1807
	III	1647 ±1069	1903 ±1573	1605 ±1019	1971 ±1140	1596 ±1367	2235 ±3065	2750 ±1240	1665 ±1238	2786 ±2825
CD35	I e II	438 ±159	585 ±306	440 ±173	612 ±293	572 ±260	606 ±444	497 ±197	540 ±224	536 ±318
	III	1115 ±453	1511 ±798	1359 ±589	1422 ±713	1677 ±908	1669 ±1024	1396 ±600	1486 ±698	1473 ±983
CD44	I e II	3828 ±1294	<b>6168<sup>a</sup></b> <b>±3190</b>	<b>8910<sup>a</sup></b> <b>±3391</b>	<b>6205<sup>a</sup></b> <b>±2790</b>	<b>4725<sup>b</sup></b> <b>±2829</b>	6115 ±4109	<b>6906<sup>a</sup></b> <b>±3429</b>	<b>7328<sup>a</sup></b> <b>±2785</b>	5904 ±4035
	III	4818 ±1512	<b>7524<sup>a</sup></b> <b>±3695</b>	<b>10190<sup>a</sup></b> <b>±3636</b>	<b>7580<sup>a</sup></b> <b>±3054</b>	<b>5775<sup>b,c</sup></b> <b>±2607</b>	7835 ±5941	7805 ±4132	<b>8691<sup>a</sup></b> <b>±2673</b>	7473 ±5651
CD45	I e II	837 ±114	<b>1357<sup>a</sup></b> <b>±655</b>	<b>1612<sup>a</sup></b> <b>±758</b>	<b>1271<sup>a</sup></b> <b>±495</b>	<b>1353<sup>a</sup></b> <b>±573</b>	<b>1488<sup>a</sup></b> <b>±1070</b>	<b>1355<sup>a</sup></b> <b>±607</b>	<b>1561<sup>a</sup></b> <b>±539</b>	<b>1490<sup>a</sup></b> <b>±997</b>
	III	947 ±142	<b>1547<sup>a</sup></b> <b>±746</b>	<b>1866<sup>a</sup></b> <b>±812</b>	<b>1434<sup>a</sup></b> <b>±627</b>	<b>1608<sup>a</sup></b> <b>±684</b>	<b>1642<sup>a</sup></b> <b>±1095</b>	<b>1457<sup>a</sup></b> <b>±703</b>	<b>1784<sup>a</sup></b> <b>±706</b>	<b>1617<sup>a</sup></b> <b>±1025</b>
CD123	I e II	6774 ±3643	4937 ±3589	3696 ±1206	5734 ±4132	3961 ±2951	4294 ±2862	4880 ±3283	5854 ±4287	4485 ±2610
	III	9680 ±5142	7718 ±6622	4469 ±1421	8923 ±7647	6239 ±4819	7664 ±6315	6597 ±3869	9234 ±10240	7629 ±5743

Resultados expressos em valores médios ± desvio padrão. Os estadios maturativos imunofenotípicos foram definidos como: estadio I e II - CD11b<sup>ele</sup>/CD13<sup>ele</sup>/CD35<sup>bx</sup>/CD33<sup>bx</sup>/ CD45<sup>ele</sup>/CD123<sup>ele</sup> e estadio III - CD11b<sup>bx</sup>/CD13<sup>bx</sup>/CD33<sup>ele</sup>/CD35<sup>ele</sup>/CD45<sup>ele</sup>/CD123<sup>ele</sup>. Com significado estatístico: <sup>a</sup> p<0.05 vs Grupo Controlo; <sup>b</sup> p<0,05 vs CRDU; <sup>c</sup> p<0,05 vs CRDM; <sup>d</sup> p<0,05 vs Baixo. Teste de comparação: Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

Na **linha a eosinófilo**, segundo a classificação OMS (2008), observou-se um aumento de expressão de **CD44** nos grupos CRDU e CRDM quando comparados com o grupo Controlo para os estadios considerados e no grupo AREB-2 apenas para o estadio III. No sistema IPSS (1997), todos os grupos expressaram de forma aumentada este recetor, quando comparados ao grupo Controlo porém para o estadio I e II. O aumento da expressão de **CD45** verificou-se no grupo CRDU para todos os estadios e no grupo CRDM para os estadios I e III, quando comparados com o grupo Controlo. Na comparação de grupos da SMD, o grupo CRDU apresentou aumento de expressão quando comparado aos grupos CRDM no estadio II, AREB-1 nos estadios I e II e AREB-2 no estadio I. Segundo o sistema IPSS (1997), o grupo de Baixo risco apresentou aumento de expressão no estadio I, o grupo Intermédio1 em todos os estadios e o grupo Intermédio2-Alto no estadio III, quando comparados com o grupo Controlo. Nesta linha hematopoiética identificou-se, na classificação OMS (2008), um decréscimo de expressão de **CD35** em todos os grupos da SMD no estadio III e no AREB-2 na população total de eosinófilos, quando comparados ao grupo Controlo. O grupo CRDU também apresentou expressão diminuída quando comparado com o grupo AREB-2. Segundo o IPSS (1997), os grupos de Baixo risco e Intermédio1 apresentaram menor expressão de CD35, no estadio I e II e na população total de eosinófilos, quando comparados com o grupo Controlo. O grupo Intermédio1 apresentou ainda diferenças quando comparado com o Intermédio2-Alto para o estadio I e II e para a população total de eosinófilos. Por fim, na classificação OMS (2008), a diminuição de **CD64** observou-se em todos os grupos da SMD quando comparados com o grupo Controlo para o estadio I e II. Segundo o sistema IPSS (1997), os grupos de Baixo risco e Intermédio1 apresentaram diminuição deste recetor celular quando comparados com o Controlo, no estadio III e na população total enquanto o grupo Intermédio2-Alto apenas apresentou na população total. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os recetores celulares: CD11b e CD13. Todas as alterações presentes nesta linha celular estão representadas na Figura 6 e Tabela 9.

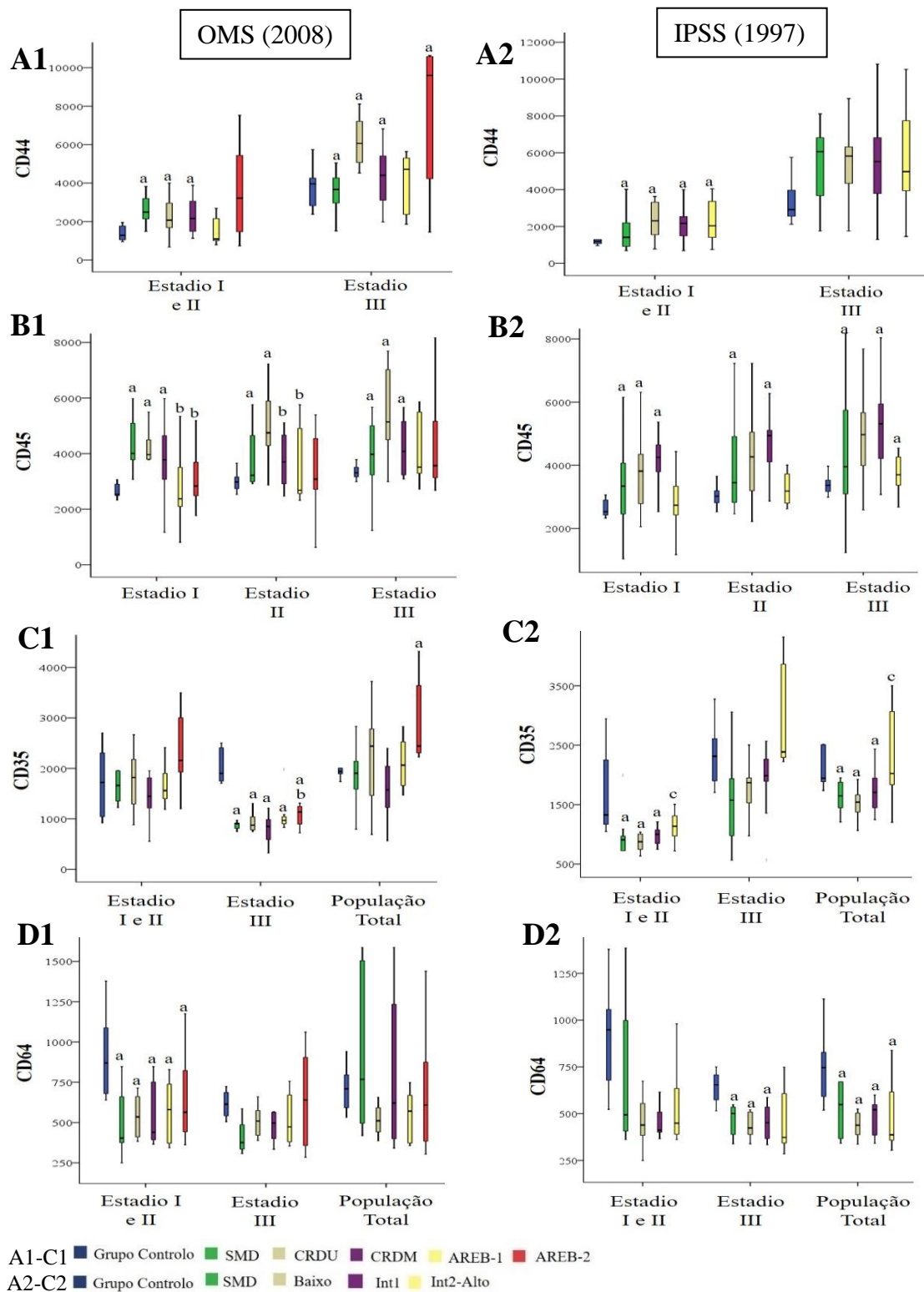


Figura 6-Gráficos de expressão de CD44, CD45, CD35 e CD64, dados pela média de intensidade de fluorescência (MIF), para a linha a eosinófilo e para os diferentes grupos da SMD mediante a classificação OMS (2008) e o sistema IPSS (1997). As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3º quartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança. Com significado estatístico para  $p < 0,05$  Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney: a) vs grupo Controlo, b) vs CRDU e c) vs Intermédio1 (A1-D1). Classificação OMS (2008); (A2-D2) Sistema IPSS (1997). (A) Expressão de CD44; (B) Expressão de CD45; (C) Expressão de CD35; (D) Expressão de CD64.

Tabela 9-Frequência das células da linha a eosinófilo na celularidade global da MO e percentagem dos estadios maturativos na frequência celular da linha a eosinófilo; expressão dos recetores celulares importantes na maturação da linha a eosinófilo, dado pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Dados obtidos em MO normais/reactivas (grupo Controlo) vs doentes diagnosticados com SMD e estratificados segundo a OMS (2008) e IPSS (1997).

		Grupo Controlo	SMD	OMS (2008)				IPSS (1997)		
				CRDU	CRDM	AREB-1	AREB-2	Baixo-R	Int1-R	Int2-Alto-R
% Eosinófilo		0,76 ±0,49	0,63 ±0,62	0,75 ±0,50	0,74 ±0,72	0,55 ±0,56	0,28 ±0,18	0,66 ±0,48	0,80 ±0,69	0,61 ±1,03
%Estadio I		4,33 ±1,23	3,85 ±1,86	3,81 ±1,61	4,19 ±2,10	3,34 1,65	3,45 ±1,24	3,99 ±2,23	4,36 ±1,83	3,56 ±1,13
%Estadio II		32,24 ±8,19	33,31 ±8,07	31,61 ±6,89	33,05 ±7,24	35,64 ±9,13	32,27 ±9,92	32,84 ±9,01	30,19 ±7,04	33,90 ±8,80
%Estadio III		63,43 ±8,52	62,99 ±8,35	64,58 ±6,90	63,11 ±8,17	60,85 ±8,50	64,28 ±9,73	63,18 ±10,16	65,46 ±7,59	62,55 ±8,62
CD11b	I	967 ±428	1005 ±718	725 ±278	1140 ±774	906 ±685	1000 ±867	849 ±336	1254 ±818	1060 ±809
	II	5982 ±3479	5204 ±3426	4692 ±2581	5463 ±3297	6177 ±2581	3888 ±2502	5282 ±3316	5872 ±3183	4371 ±2040
	III	14305 ±6578	11691 ±6292	11079 ±5203	11180 ±6038	14418 ±8994	10694 ±3688	10815 ±5255	12081 ±5505	10249 ±4922
CD13	I	3207 ±3072	3633 ±2400	1944 ±1489	3665 ±2266	3928 ±2553	4655 ±2826	3291 ±2295	2937 ±2166	4362 ±2606
	II	2837 ±1999	2657 ±1831	1416 ±481	2383 ±1495	3041 ±1548	4017 ±2821	2118 ±1232	2222 ±1454	3809 ±2592
	III	4865 ±2144	4501 ±2510	2827 ±1174	4241 ±2266	4962 ±2342	6148 ±3367	3831 ±2219	4086 ±1847	6047 ±3221
CD35	I e II	1618 ±706	1883 ±729	1766 ±614	1719 ±637	1880 ±844	2489 ±718	<b>1105<sup>a</sup></b> <b>±550</b>	<b>903<sup>a</sup></b> <b>±300</b>	<b>1337<sup>c</sup></b> <b>±561</b>
	III	2410 ±711	<b>1090<sup>a</sup></b> <b>±482</b>	<b>912<sup>a</sup></b> <b>±325</b>	<b>1006<sup>a</sup></b> <b>±416</b>	<b>1143<sup>a</sup></b> <b>±527</b>	<b>1420<sup>a,b</sup></b> <b>±608</b>	2159 ±755	2032 ±766	2795 ±799
	População total	2135 ±529	2337 ±932	2173 ±1004	2084 ±755	2373 ±1019	<b>3164<sup>a</sup></b> <b>±873</b>	<b>1811<sup>a</sup></b> <b>±733</b>	<b>1653<sup>a</sup></b> <b>±546</b>	<b>2220<sup>c</sup></b> <b>±699</b>
CD44	I e II	1281 ±334	<b>2587<sup>a</sup></b> <b>±2689</b>	<b>2293<sup>a</sup></b> <b>±1116</b>	<b>2277<sup>a</sup></b> <b>±2176</b>	2779 ±3669	3647 ±3600	<b>2753<sup>a</sup></b> <b>±3271</b>	<b>2164<sup>a</sup></b> <b>±988</b>	<b>3001<sup>a</sup></b> <b>±3060</b>
	III	3260 ±1032	<b>5669<sup>a</sup></b> <b>±4396</b>	<b>6106<sup>a</sup></b> <b>±2947</b>	<b>5049<sup>a</sup></b> <b>±3650</b>	5645 ±5220	<b>7664<sup>a</sup></b> <b>±6150</b>	5924 ±5291	5447 ±2471	6668 ±5596
CD45	I	2620 ±243	<b>3280<sup>a</sup></b> <b>±1269</b>	<b>4303<sup>a</sup></b> <b>±1126</b>	<b>3268<sup>a</sup></b> <b>±1244</b>	<b>2923<sup>b</sup></b> <b>±1069</b>	<b>3156<sup>b</sup></b> <b>±1467</b>	<b>3542<sup>a</sup></b> <b>±1424</b>	<b>3893<sup>a</sup></b> <b>±1140</b>	3272 ±1349
	II	3026 ±314	<b>3729<sup>a</sup></b> <b>±1409</b>	<b>4994<sup>a</sup></b> <b>±1338</b>	<b>3638<sup>b</sup></b> <b>±1330</b>	<b>3379<sup>b</sup></b> <b>±1201</b>	3704 ±1676	3959 ±1565	<b>4419<sup>a</sup></b> <b>±1305</b>	3831 ±1569
	III	3388 ±269	<b>4251<sup>a</sup></b> <b>±1536</b>	<b>5500<sup>a</sup></b> <b>±1613</b>	<b>4182<sup>a</sup></b> <b>±1468</b>	3969 ±1233	4098 ±1837	4426 ±1606	<b>4993<sup>a</sup></b> <b>±1489</b>	<b>4373<sup>a</sup></b> <b>±1803</b>
CD64	I e II	983 ±528	<b>602<sup>a</sup></b> <b>±338</b>	<b>623<sup>a</sup></b> <b>±328</b>	<b>576<sup>a</sup></b> <b>±386</b>	<b>652<sup>a</sup></b> <b>±289</b>	<b>602<sup>a</sup></b> <b>±273</b>	677 ±517	531 ±247	521 ±182
	III	628 ±85	558 ±283	507 ±96	509 ±200	578 ±322	726 ±475	<b>553<sup>a</sup></b> <b>±250</b>	<b>476<sup>a</sup></b> <b>±107</b>	564 ±272
	População total	731 ±165	630 ±454	613 ±337	632 ±558	609 ±302	659 ±350	<b>592<sup>a</sup></b> <b>±315</b>	<b>695<sup>a</sup></b> <b>±696</b>	<b>541<sup>a</sup></b> <b>±207</b>

Resultados expressos em valores médios ± desvio padrão. Os estadios maturativos imunofenotípicos foram definidos como: estadio I - CD11b<sup>bx/int</sup>/CD13<sup>ele/int</sup>/CD33<sup>ele</sup>/CD35<sup>ele</sup>/CD44<sup>bx</sup>/CD64<sup>ele</sup>/CD71<sup>ele</sup>; estadio II - CD11b<sup>int</sup>/CD13<sup>int</sup>/CD33<sup>ele</sup>/CD35<sup>ele</sup>/CD44<sup>int</sup>/CD64<sup>ele</sup>/CD71<sup>ele</sup>; estadio III - CD11b<sup>ele</sup>/CD13<sup>ele</sup>/CD33<sup>int</sup>/CD35<sup>int</sup>/CD44<sup>ele</sup>/CD64<sup>int</sup>/CD71<sup>bx/int</sup>. Com significado estatístico: <sup>a</sup> p<0,05 vs Grupo Controlo ; <sup>b</sup> p<0,05 vs CRDU; <sup>c</sup> p<0,05 vs Int1. Teste de comparação: Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.



Na **linha a célula dendrítica plasmacitóide**, o aumento da expressão de **CD44**, mediante a classificação OMS (2008), verificou-se nos grupos CRDU, CRDM e AREB-2 quando comparados com o grupo Controlo, para os dois estadios maturativos. O grupo CRDU apresentou, ainda, aumento de expressão na comparação com os grupos CRDM e AREB-1, para o estadio I e II. No sistema IPSS (1997), os grupos Intermédio1 e Intermédio2-Alto apresentaram aumento de expressão quando comparados com o grupo Controlo, para os estadios considerados e para a população total de célula dendrítica plasmacitóide. O grupo Intermédio1 apresentou, ainda, aumento de expressão quando comparado com o grupo de Baixo risco, para os estadios maturativos considerados. O aumento da expressão de **CD45**, na classificação OMS (2008), ocorreu nos grupos CRDU e CRDM quando comparados com o grupo Controlo, para os diferentes estadios e para a população total de célula dendrítica plasmacitóide e, no grupo AREB-2 para os estadios maturativos considerados. O grupo CRDU apresentou aumento de expressão quando comparado com os grupos CRDM, AREB-1 e AREB-2, na população total de célula dendrítica plasmacitóide. Segundo o sistema IPSS (1997), o grupo de Baixo risco apresentou aumento de expressão de CD45 no estadio III, o grupo Intermédio1 nos diferentes estadios maturativos e na população total de célula dendrítica plasmacitóide e, o grupo Intermédio2-Alto apenas para os estadios maturativos quando comparados com o grupo Controlo. O grupo Intermédio1 apresentou aumento deste recetor celular quando comparado com o grupo de Baixo risco, no estadio I e II enquanto o grupo Intermédio2-Alto apresentou aumento quando comparado com o Intermédio1 na população total de célula dendrítica plasmacitóide. Não foram observadas diferenças estatísticas para os recetores celulares: CD34, CD117, CD123, CD133 e HLA-DR. As alterações supramencionadas estão representadas na Figura 7 e Tabela 10.

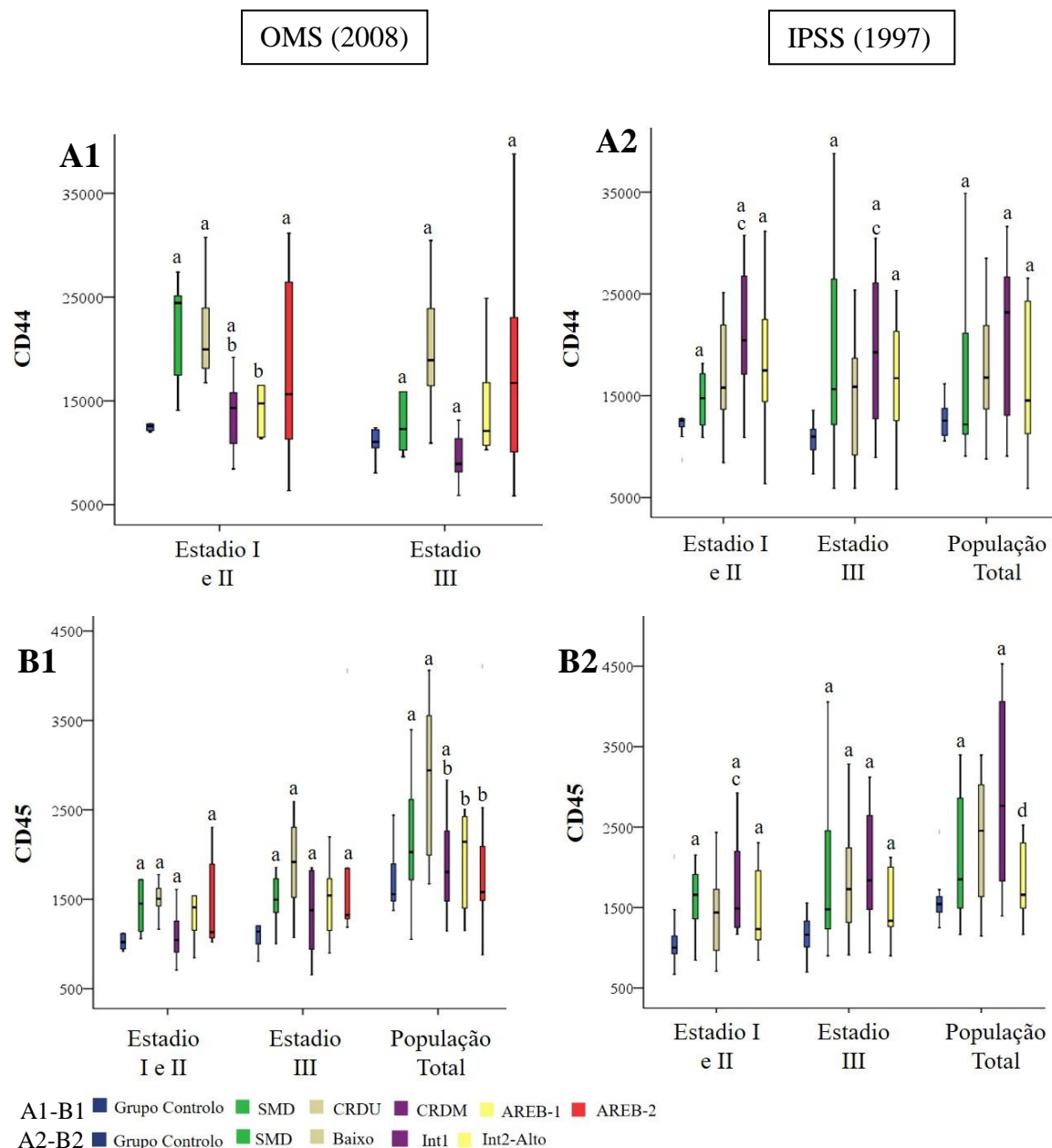


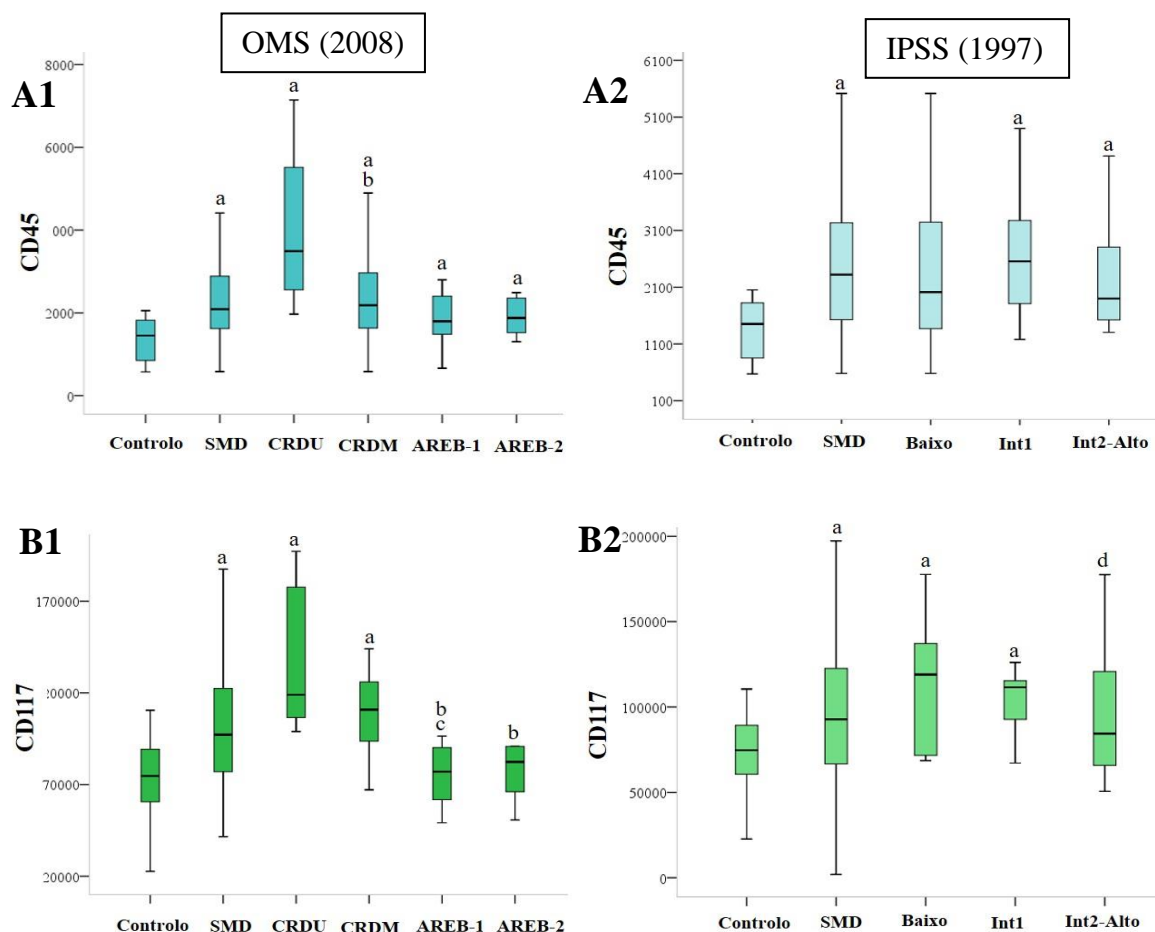
Figura 7-Gráficos de expressão de CD44 e CD45, dados pela média de intensidade de fluorescência (MIF), para a linha a célula dendrítica plasmacitóide e para os diferentes grupos da SMD mediante a classificação OMS (2008) e o sistema IPSS (1997). As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3º quartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança. Com significado estatístico para  $p < 0,05$  Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney: a) vs grupo Controllo, b) vs CRDU, c) vs Baixo risco e d) vs Int1. (A1-B1) Classificação OMS (2008); (A2-B2) Sistema IPSS (1997). (A) Expressão de CD44; (B) Expressão de CD45.

Tabela 10-Frequência das células da linha a célula dendrítica plasmacitóide na celularidade global da MO e percentagem dos estadios maturativos na frequência celular da linha célula dendrítica plasmacitóide; expressão dos recetores celulares importantes na maturação da linha a célula dendrítica plasmacitóide, dado pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Dados obtidos em MO normais/reativas (grupo Controlo) vs doentes diagnosticados com SMD e estratificados segundo a OMS (2008) e IPSS (1997).

		Grupo Controlo	SMD	OMS (2008)				IPSS (1997)		
				CRDU	CRDM	AREB-1	AREB-2	Baixo	Int1	Int2-Alto
% pDC		0,20 ±0,12	0,32 ±0,32	0,44 ±0,60	0,30 ±0,28	0,30 ±0,25	0,29 ±0,27	0,36 ±0,33	0,33 ±0,43	0,34 ±0,27
%Estadio I e II		38,18 ±8,07	36,50 ±11,81	41,08 ±7,89	38,48 ±11,64	30,98 ±11,87	34,50 ±12,68	41,09 ±12,93	37,15 ±10,47	36,52 ±11,49
%Estadio II		61,83 ±8,07	63,60 ±11,84	58,86 ±7,80	61,52 ±11,66	69,48 ±11,71	65,50 ±12,68	58,89 ±14,91	62,85 ±10,47	63,48 ±11,50
CD34	I e II	1937 ±647	2303 ±1702	2348 ±2391	2496 ±1760	1998 ±1553	1989 ±1315	2298 ±1493	2280 ±1493	1802 ±1221
	III	1374 ±647	1480 ±935	1662 ±1523	1589 ±997	1294 ±677	1229 ±540	1490 ±906	1505 ±1363	1168 ±510
CD44	I e II	12449 ±1509	<b>17310<sup>a</sup></b> <b>±6156</b>	<b>21909<sup>a</sup></b> <b>±5634</b>	<b>16729<sup>a,b</sup></b> <b>±5158</b>	<b>15563<sup>b</sup></b> <b>±6586</b>	<b>19668<sup>a</sup></b> <b>±8778</b>	15718 ±5340	<b>22699<sup>a,c</sup></b> <b>±8191</b>	<b>18516<sup>a</sup></b> <b>±7647</b>
	III	10726 ±1722	<b>16007<sup>a</sup></b> <b>±6665</b>	<b>20129<sup>a</sup></b> <b>±7425</b>	<b>14821<sup>a</sup></b> <b>±5841</b>	15014 ±5245	<b>19366<sup>a</sup></b> <b>±10120</b>	13635 ±5974	<b>21435<sup>a,c</sup></b> <b>±9618</b>	<b>17899<sup>a</sup></b> <b>±8904</b>
	População total	12680 ±1622	17964 ±7501	20801 ±8058	17224 ±6373	17746 ±6539	19361 ±12464	15982 ±5767	<b>22960<sup>a</sup></b> <b>±9275</b>	<b>18334<sup>a</sup></b> <b>±10903</b>
CD45	I e II	1079 ±356	<b>1462<sup>a</sup></b> <b>±572</b>	<b>1500<sup>a</sup></b> <b>±207</b>	<b>1475<sup>a</sup></b> <b>±590</b>	1329 ±468	<b>1607<sup>a</sup></b> <b>±816</b>	1427 ±668	<b>2120<sup>a,c</sup></b> <b>±1749</b>	<b>1576<sup>a</sup></b> <b>±743</b>
	III	1155 ±300	<b>1661<sup>a</sup></b> <b>±659</b>	<b>1887<sup>a</sup></b> <b>±544</b>	<b>1642<sup>a</sup></b> <b>±616</b>	1482 ±471	<b>1885<sup>a</sup></b> <b>±1070</b>	<b>1647<sup>a</sup></b> <b>±675</b>	<b>2332<sup>a</sup></b> <b>±1623</b>	<b>1823<sup>a</sup></b> <b>±960</b>
	População total	1600 ±330	<b>2512<sup>a</sup></b> <b>±3309</b>	<b>6101<sup>a</sup></b> <b>±9752</b>	<b>2183<sup>a,b</sup></b> <b>±804</b>	<b>1899<sup>b</sup></b> <b>±474</b>	<b>2021<sup>b</sup></b> <b>±1017</b>	3778 ±6833	<b>2901<sup>a</sup></b> <b>±1475</b>	<b>2061<sup>d</sup></b> <b>±905</b>
CD117	I e II	852 ±452	1305 ±1486	999 ±1033	1300 ±1684	1327 ±1309	1496 ±1324	1402 ±2317	1103 ±995	1264 ±1216
	III	-	404 ±946	2324 ±3224	287 ±292	157 ±143	168 ±257	228 ±330	975 ±1788	168 ±257
CD123	I e II	8343 ±4347	6812 ±3623	4048 ±1158	6843 ±2982	7232 ±3948	7830 ±5740	5803 ±2506	4343 ±2299	7817 ±5138
	III	8871 ±3936	7919 ±3541	5191 ±1240	8170 ±2737	7849 ±4108	8824 ±5696	7185 ±2723	5704 ±2195	8576 ±5127
	População total	8511 ±4067	7831 ±3869	4322 ±1738	7865 ±2897	7665 ±3767	10762 ±6263	6641 ±2394	6317 ±3114	9972 ±5806
CD133	I e II	138 ±76	573 ±2057	320 ±142	247 ±191	1290 ±4059	860 ±1947	258 ±210	1212 ±3930	696 ±1688
	III	72 ±36	488 ±2216	137 ±53	111 ±49	1272 ±4256	1016 ±2781	107 ±47	1097 ±3989	789 ±2408
HLA-DR	I e II	18453 ±11570	14677 ±9776	12895 ±10933	16535 ±9916	10839 ±8248	14620 ±10308	15888 ±10835	13972 ±9466	14108 ±9658
	III	9972 ±4389	9037 ±5653	6048 ±3656	9725 ±5733	8187 ±5491	9614 ±6629	8924 ±5783	7405 ±4031	9277 ±6033
	População total	13427 ±7420	10416 ±6231	6150 ±3433	11638 ±6366	9184 ±6312	10757 ±6150	10435 ±6547	8074 ±4055	10903 ±5799

Resultados expressos em valores médios ± desvio padrão. Os estadios maturativos imunofenotípicos foram definidos como: estadio I e II - CD117<sup>ele/int</sup>/HLA-DR<sup>ele</sup>; estadio II - CD117<sup>int/bx</sup>/HLA-DR<sup>int</sup>. Com significado estatístico: <sup>a</sup> p<0,05 vs Grupo Controlo; <sup>b</sup> p<0,05 vs CRDU; <sup>c</sup> p<0,05 vs Baixo; <sup>d</sup> p<0,05 vs Int1. Teste de comparação: Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

Na linha a mastócito, segundo a classificação OMS (2008), o aumento da expressão de **CD45** ocorreu em todos os grupos da SMD quando comparados com o grupo Controlo. O grupo CRDU apresentou, ainda, aumento de expressão quando comparado com o CRDM. Segundo o IPSS (1997), o aumento de expressão de CD45 ocorreu nos grupos Intermédio1 e Intermédio2-Alto, quando comparados com o grupo Controlo. Segundo a classificação OMS (2008), observou-se um aumento na expressão de **CD117** no grupo CRDU quando comparado com o grupo Controlo, AREB-1 e AREB-2. O grupo CRDM apresentou aumento de expressão quando comparado com o AREB-1. No sistema IPSS (1997), os grupos de Baixo risco e Intermédio1 apresentaram aumento da expressão de CD117 quando comparados com o grupo Controlo. O grupo Intermédio1 apresentou ainda aumento de expressão quando comparado com o Intermédio2-Alto. Por fim, para a classificação proposta pela OMS (2008), o aumento da expressão de **HLA-DR** foi observado nos grupos CRDM e AREB-1 quando comparados com o grupo Controlo e quando comparados entre si. Com base no IPSS (1997), todos os grupos considerados apresentaram aumento de expressão após comparação com o grupo Controlo. Não foram observadas diferenças de expressão para os recetores celulares: CD13, CD33, CD35, CD44 e CD123. As alterações presentes nesta linha estão representadas na Figura 8 e Tabela 11.



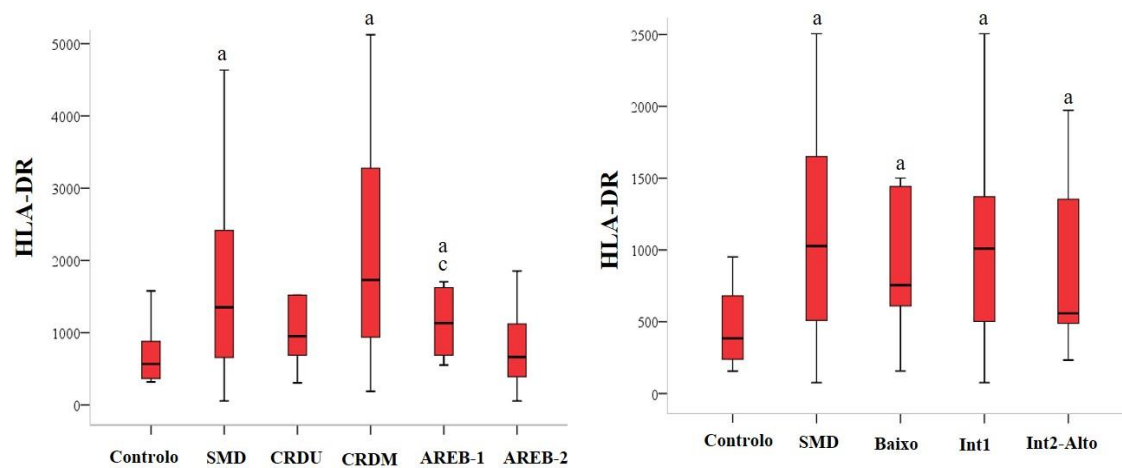


Figura 8- Gráficos de expressão de CD45, CD117 e HLA-DR, dados pela média de intensidade de fluorescência (MIF), para a linha a mastócito e para os diferentes grupos da SMD mediante a classificação OMS (2008) e o sistema IPSS (1997). As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3ºquartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança. Com significado estatístico para  $p < 0,05$  Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney: a) vs grupo Controlo; b) vs CRDU, c) vs CRDM e d) vs Int1. (A1-C1) Classificação OMS (2008); (A2-C2) Sistema IPSS (1997). (A) Expressão de CD45; (B) Expressão de CD117; (C) Expressão de HLA-DR.

Tabela 11-Frequência das células da linha a mastócito na celularidade global da MO; expressão dos recetores celulares importantes na maturação da linha a mastócito, dado pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Dados obtidos em MO normais/reativas (grupo Controlo) vs doentes diagnosticados com SMD e estratificados segundo a OMS (2008) e IPSS (1997).

	Grupo Controlo	SMD	OMS (2008)				IPSS (1997)		
			CRDU	CRDM	AREB-1	AREB-2	Baixo	Int1	Int2-Alto
%Mastócitos	0,285 ±0,05	0,027 ±0,04	0,033 ±0,03	0,028 ±0,03	0,013 ±0,01	0,039 ±0,07	0,027 ±0,02	0,033 ±0,06	0,031 ±0,05
CD13	1431 ±832	1559 ±1416	1825 ±2099	1427 ±1064	1190 ±421	2247 ±2410	1328 ±860	1559 ±1494	1920 ±2099
CD33	8822 ±3984	8244 ±4697	9567 ±2536	9287 ±5060	7493 ±4496	5248 ±3672	8413 ±2359	10447 ±4868	5824 ±3345
CD35	346 ±138	648 ±547	867 ±705	722 ±635	594 ±359	374 ±152	734 ±560	595 ±602	612 ±680
CD44	31093 ±15029	40194 ±20877	59921 ±26486	40050 ±21719	34786 ±18806	37108 ±13405	44758 ±24911	48976 ±22266	33523 ±15395
CD45	1344 ±529	<b>2353<sup>a</sup></b> <b>±1137</b>	<b>4028<sup>a</sup></b> <b>±1946</b>	<b>2300<sup>a,b</sup></b> <b>±957</b>	<b>1969<sup>a</sup></b> <b>±840</b>	<b>2125<sup>a</sup></b> <b>±811</b>	2643 ±1939	<b>2631<sup>a</sup></b> <b>±970</b>	<b>2301<sup>a</sup></b> <b>±979</b>
CD117	75084 ±23736	<b>103719<sup>a</sup></b> <b>±37106</b>	<b>139873<sup>a</sup></b> <b>±44544</b>	<b>108723<sup>a</sup></b> <b>±30251</b>	<b>84314<sup>b,c</sup></b> <b>±35740</b>	<b>91854<sup>b</sup></b> <b>±38829</b>	<b>114412<sup>a</sup></b> <b>±37843</b>	<b>120474<sup>a</sup></b> <b>±37564</b>	<b>95439<sup>d</sup></b> <b>±38110</b>
CD123	360 ±267	380 ±384	117 ±77	389 ±439	392 ±305	453 ±344	503 ±604	241 ±177	471 ±341
HLA-DR	449 ±265	<b>1019<sup>a</sup></b> <b>±1010</b>	1111 ±290	<b>1105<sup>a</sup></b> <b>±1340</b>	<b>768<sup>a,c</sup></b> <b>±512</b>	956 ±569	<b>1343<sup>a</sup></b> <b>±1530</b>	<b>1273<sup>a</sup></b> <b>±1181</b>	<b>1712<sup>a</sup></b> <b>±3146</b>

Resultados expressos em valores médios ± desvio padrão. Com significado estatístico: <sup>a</sup> p<0,05 vs Grupo Controlo; <sup>b</sup> p<0,05 vs CRDU ; <sup>c</sup> p<0,05 vs CRDM ; <sup>d</sup> p<0,05 vs Int1. Teste de comparação: Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

## 9.2-Expressão dos genes *Triptase* e *Peroxidase do Eosinófilo*

A expressão dos genes *Triptase* e *Peroxidase do Eosinófilo* (na população de basófilos e eosinófilos, respetivamente) demonstrou um aumento de expressão destes genes nas amostras previamente diagnosticadas com SMD quando comparadas com o grupo Controlo. As diferenças de expressão dos dois genes apresentaram significado estatístico semelhante,  $pvalue=0,045$  para o gene *Triptase* e  $pvalue=0,042$  para o gene *Peroxidase do Eosinófilo* (Figura 10). É de referir que, as amostras diagnosticadas com SMD apenas foram classificadas segundo a OMS (2008) e que, devido ao número reduzido de amostras, não foi possível correlacionar a diferença de expressão dos genes entre os diferentes grupos da SMD com o grupo Controlo.

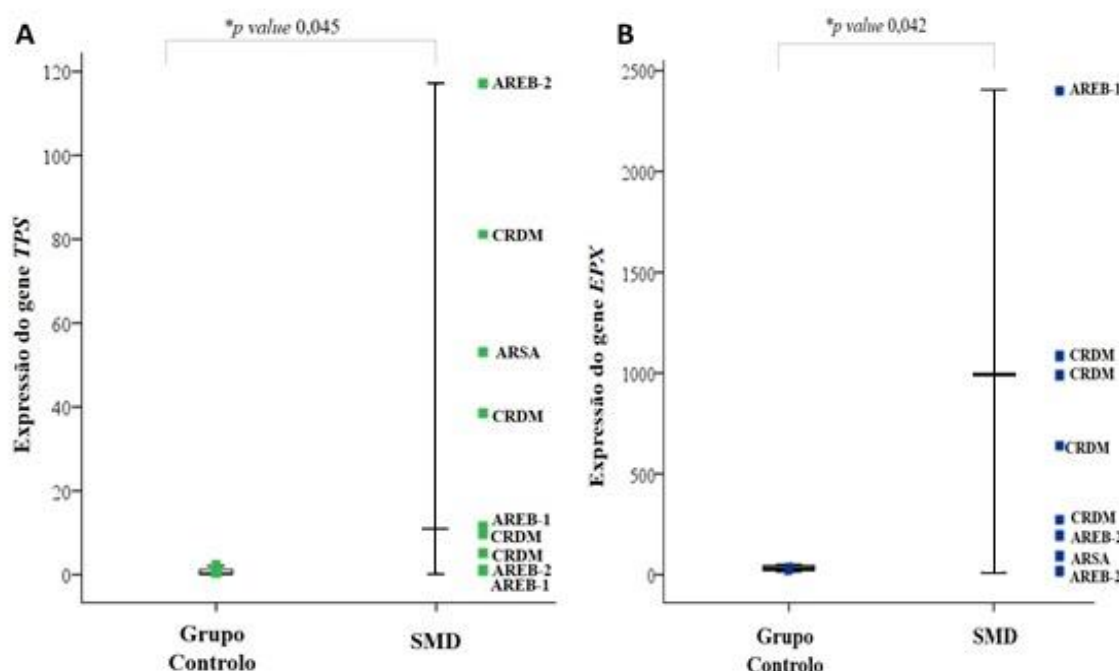


Figura 9-Expressão dos genes *Triptase* e *Peroxidase do Eosinófilo* em amostras de MO normais/reactivas (grupo Controlo) e MO diagnosticadas com SMD de acordo com os critérios propostos pela OMS (2008). (A) Expressão do gene *Triptase* para a população de basófilos; (B) Expressão do gene *Peroxidase do Eosinófilo* para a população de eosinófilos. Valores dados pela normalização da expressão do gene em estudo com o gene de referência *GAPDH*, pelo método do delta-Ct. As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3º quartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança. Com significado estatístico para  $p<0,05$  Teste de Mann-Whitney: \* vs grupo Controlo.





## **Discussão**

---



## Capítulo 10-Discussão dos Resultados

### 10.1-Caraterização Imunofenotípica

Em 2014, o International/European Leukemia Net Working Group sugeriu a integração da citometria de fluxo no apoio ao diagnóstico da SMD uma vez que, alterações na expressão de diferentes antígenos são sinais evidentes de uma maturação aberrante proveniente de uma desregulação na hematopoiese (1,68). Estas alterações são sobretudo observadas na maturação de células mielóides displásicas, nomeadamente na linha granulocítica, monocítica e eritróide, que correspondem às linhas mais representadas da MO (82,97). Descrever a maturação de diferentes linhas mielóides nas linhas minoritárias da MO é relevante para a compreensão do impacto das alterações genéticas e das alterações imunofenotípicas na expressão de proteínas e na funcionalidade da célula. É de referir que, este tipo de estudo, nas linhas minoritárias da MO é extremamente limitado (80) . Neste contexto, este trabalho permitiu a análise destas linhas hematopoiéticas, em SMD, verificando a existência de alterações imunofenotípicas e/ou funcionais, bem como, denotar a relevância para o diagnóstico em especial nos grupos CRDU e CRDM. As principais alterações estatisticamente significativas consistiram no aumento da expressão de **CD44** e **CD45** transversal às diferentes linhas hematopoiéticas em estudo, diminuição de expressão de **CD13** na linha a basófilo e de **CD35** e **CD64** na linha a eosinófilo e aumento de expressão de **CD117** e **HLA-DR** na linha a mastócito.

O padrão de expressão de **CD44** manteve-se aumentado em todas as linhas hematopoiéticas estudadas à exceção da linha a mastócito. CD44 é uma glicoproteína transmembranar que, devido à possibilidade de diferentes mecanismos de *splicing*, apresenta diferentes isoformas (98). Este marcador celular é um recetor para o ácido hialurónico, um polímero dissacarídeo presente na matriz extracelular. O ácido hialurónico está envolvido num elevado número de atividades biológicas que compreendem a hidratação de tecidos para a mobilidade, proliferação e diferenciação celular (99). A interação das isoformas de CD44 com materiais da matriz extracelular, como é o caso do ácido hialurónico, poderá submeter as células epiteliais a uma mitógenese anormal e migração. Este poderá ser o mecanismo crítico no processo de invasão tumoral e metástase (100). Noutra perspetiva, verifica-se uma inibição da expressão de CD44 pelo gene tp53 através da sua ligação a uma sequência promotora do CD44. Desta forma, uma mutação no gene tp53, poderá comprometer a sua função e consequentemente deixar de exercer mecanismo de *feedback* negativo sobre a

expressão de CD44. Assim, a expressão exacerbada de CD44 tornar-se-á essencial para a transformação de células com déficit de tp53 em células tumorais (101). Na linha eritróide, em SMD, a elevada expressão deste recetor celular ocorre em diferentes estádios maturativos, em particular nos grupos mais avançados da patologia (OMS (2008): AREB-1 e AREB-2; IPSS (1997): Intermédio 2 e Alto risco). Observa-se, ainda, uma correlação entre a elevada expressão deste recetor celular e a diminuição da taxa de sobrevivência (97,102). Neste estudo verificou-se, claramente, um aumento de expressão de CD44 (linha a basófilo: OMS (2008), 46% dos casos; IPSS (1997), 60%; linha a eosinófilo: OMS (2008), 48%; IPSS (1997), 57%; linha a célula dendrítica plasmacitóide; OMS (2008), 48%; IPSS (1997), 44%). Este aumento de expressão ocorreu em todos os grupos da SMD não se destacando nenhum em particular. O expectável seria um aumento pronunciado de expressão nos grupos AREB-1 e 2 para a OMS (2008) e Intermédio2-Alto para IPSS (1997), uma vez que, são grupos associados a um prognóstico clínico mais reservado e a uma esperança média de sobrevivência inferior. É pertinente referir que, este estudo não contemplou a análise citogenética de mutações tp53, que poderia explicar o aumento da expressão de CD44 nos diferentes grupos. Este tipo de mutações é relativamente frequente apresentando uma taxa de incidência entre 5 a 15%.

O aumento da expressão de **CD45** foi observado em todas as linhas hematopoiéticas estudadas. O CD45 é uma glicoproteína transmembranar que, há semelhança do CD44, pode apresentar diferentes isoformas mediante o mecanismo de *splicing*. O CD45 é um recetor do tipo tirosina fosfatase cujo substrato consiste em membros da família cinase (Src), um proto-oncogene (103,104). Src atua como molécula de controlo geral em diferentes vias de sinalização, nomeadamente, regula a proteína cinase ativada por mitogénio, a cinase 3-inositol trifosfato bem como o transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (105). Torna-se claramente perceptível a importância desta família de cinases na regulação da proliferação celular, viabilidade, metabolismo, diferenciação e migração (106). Evidências sugerem que o CD45 pode promover a inativação da família de cinases Src, contudo, é difícil distinguir se o CD45 desfosforila diretamente o substrato ou se impede a fosforilação por inativação da cinase. Observa-se o aumento da atividade desta família de proteínas em diferentes tipos de cancro sendo, nesse caso, classificadas como proteínas oncogénicas (105,107). Na linha monocítica, em SMD, verifica-se uma diminuição da expressão de CD45 especialmente nos grupos AREB-1 e AREB-2 o que adverte para uma possível evolução da doença. Assim, a

baixa expressão de CD45 permite discriminar os grupos AREB dos restantes grupos da SMD (108). Contudo, neste estudo, verificou-se o aumento da expressão de CD45 em todas as linhas hematopoiéticas em estudo nos difentes estadios considerados (linha a basófilo: OMS (2008), 67% dos casos; IPSS (1997), 70%; linha a eosinófilo: OMS (2008), 51%; IPSS (1997), 62%; linha a célula dendrítica plasmacitóide: OMS (2008), 37%; IPSS (1997), 47%; linha a mastócito: OMS (2008), 45%; IPSS (1997), 53%). O aumento da expressão de CD45 observou-se em todos os grupos da SMD sem especial incidência.

O decréscimo na expressão de **CD13** foi observado na linha a basófilo. O CD13 é uma metaloprotease de ligação a zinco, expressa na membrana, que degrada péptidos reguladores. Esta metaloprotease é expressa em células precursoras hematopoiéticas comprometidas à linha mielóide (109). Em SMD, a elevada expressão de CD13 nos estadios mais maduros dos neutrófilos e, conseqüentemente, um padrão alterado na expressão de proteínas está correlacionado com uma diminuição na taxa de sobrevivência (80,81). Devido à sua variabilidade de expressão ao longo da maturação, este recetor celular é pertinente para o diagnóstico e um parâmetro de prognóstico (81). Neste estudo, a diminuição da expressão de CD13 apresentou uma baixa taxa de incidência que correspondeu essencialmente aos grupos CRDU e Baixo risco (OMS (2008), 22% dos casos; IPSS (1997), 37%). Estes grupos estão associados a um prognóstico clínico mais favorável e a uma maior taxa de sobrevivência. É de referir que, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão de CD13 para os grupos de maior risco da SMD (OMS, AREB-2; IPSS, Intermédio2-Alto), porém os mesmos apresentaram um ligeiro aumento na expressão deste recetor celular.

Paralelamente, observou-se uma diminuição na expressão de CD35 e CD64 na linha a eosinófilo. O **CD35** é uma proteína codificada pelo gene *CR1* (*Complement receptor 1*). Este gene é membro da família de reguladores da ativação do complemento. Esta proteína pode apresentar diferentes isoformas pelas variações de *splicing* em alelos específicos. O CD35 medeia a ligação de partículas e de imunocomplexos que tenham ativado o complemento e, como tal, a diminuição da sua expressão e/ou mutações no gene codificante encontra-se associada a carcinomas, glomerulonefrites e lupus eritematoso sistémico (110). Em SMD, observa-se que a expressão deste recetor celular está frequentemente alterada nos subtipos mais avançados (OMS (2008), AREB-2; IPSS (1997), Intermédio2-Alto) (97). No nosso estudo, a diminuição da expressão de CD35 apresentou uma baixa taxa de incidência, similar

em todos os grupos da SMD em diferentes estadios (OMS (2008) no estadio III: 25% dos casos; IPSS (1997) no estadio I e II e população total: 30%).

O **CD64** é uma glicoproteína intrínseca à membrana que liga, com elevada afinidade, Imunoglobulina G (IgG). Após ligar IgG, o CD64 interatua com uma cadeia acessória conhecida como a cadeia  $\gamma$  que tem como principal funcionalidade permitir o desencadeamento da atividade celular (111,112). Em SMD, na linha granulocítica já foi descrita uma diminuição na expressão de CD64 (113). Neste estudo, a diminuição da expressão de CD64 apresentou uma taxa de incidência elevada e mantida nos diferentes grupos da SMD (OMS (2008) no estadio I e II: 66% dos casos; IPSS (1997) no estadio III e população total: 70%). Analisando em conjunto a expressão de CD35 e CD64 observa-se que, na maturação da linha a neutrófilo, a expressão do recetor CD35 na superfície celular ocorre no último estadio maturativo (neutrófilos em banda e maduros) enquanto a expressão do recetor CD64 ocorre em estadios mais imaturos, nomeadamente, na fase de promielócito, mielócito e metamielócito não sendo expresso nos estadios finais da maturação (114). Integrando os resultados e transpondo para a linha a eosinófilo, que apresenta uma maturação similar à linha a neutrófilo visto que são células granulocíticas com percursos morfológicos comuns, a diminuição da expressão destes recetores celulares poderá estar subjacente a um predomínio de células fenotipicamente imaturas.

Observou-se um aumento na expressão de CD117 e HLA-DR na linha a mastócito. O **CD117** é um recetor de proteína transmembranar codificado pelo proto-oncogene c-kit, pertence ao tipo III da família de recetores de cinases, que atua como recetor para fatores de crescimento de mastócitos. Este recetor pode ser detetado em diferentes células, incluindo células estaminais hematopoiéticas, células germinativas e melanócitos (115,116). Correlaciona-se uma desregulação de c-kit como possível causa de várias neoplasias das quais se destaca a Leucemia mieloblástica aguda e o tumor de células germinais (117). Verifica-se que o tratamento com imatinib, um inibidor de c-kit, aumenta de forma significativa a taxa de sobrevivência dos doentes com mutações neste gene (118). Os nossos resultados demonstraram um aumento da expressão deste recetor mas com baixa incidência sendo sobretudo evidenciada pelos grupos CRDU e Intermédio1 (OMS (2008): 28% dos casos, IPSS (1997): 37%).

O **HLA-DR** é um recetor de superfície celular pertencente ao complexo major de histocompatibilidade de classe II. A principal função das células que expressam HLA-DR é

endocitar e digerir enzimaticamente os antígenos para, posteriormente, os apresentar aos linfócitos T auxiliares (119,120). O aumento de expressão de HLA-DR apresentou baixa incidência (OMS: 27% dos casos; IPSS: 35%). Conjugando a expressão de CD117 e HLA-DR verifica-se que, ao longo da maturação normal da linha a mastócito, a elevada expressão de CD117 é mantida ao longo de toda a maturação havendo apenas uma ligeira diminuição nos precursores mais imaturos. Por outro lado, verifica-se que os precursores mais imaturos são as únicas células que expressam HLA-DR (121). Em SMD, é descrito que as células mais imaturas da linha a mastócito apresentam, frequentemente, expressões extremamente elevadas de CD117, o que está de acordo com os resultados obtidos (122). Analisando todas as alterações obtidas observamos que, em SMD, prevalecem células imunofenotipicamente imaturas.

### **10.2-Expressão dos genes *Triptase* e *Peroxidase do Eosinófilo***

O conhecimento das funções dos basófilos tem sido desde há muito restrito à sua capacidade para libertar mediadores inflamatórios durante as reações alérgicas. Contudo, resultados recentes de um estudo em modelos animais sugere que os basófilos podem exercer funções imunoreguladoras durante respostas imunes (123). A triptase é normalmente expressa em mastócitos e basófilos e deriva de 2 genes em tandem no cromossoma 16p13.3 (124). Estudos demonstraram que blastos de LMA apresentam elevados níveis de triptase. O significado patogénico desta expressão excessiva nos blastos ainda não está estabelecido, porém, é discutida a hipótese que a triptase estimula a formação de tubos vasculares e pode ser um fator angiogénico relevante (125,126). Em mastócitos, a triptase é segregada maioritariamente a partir de protriptase, isto é, a partir de células mais imaturas da triptase (127). Embora de linhagens hematopoiéticas diferentes, os basófilos partilham diversas características e funções comuns com os mastócitos o que os torna constitutivamente semelhantes (128). A elevada expressão de *TPS* e, consequentemente a elevada expressão da proteína triptase, nas amostras de SMD poderá estar subjacente a um predomínio de células imaturas.

Os eosinófilos são células efectoras que apresentam um espectro de mediadores incluindo proteínas de grânulos citotóxicos, enzimas proteolíticas, espécies reativas de oxigénio e várias citocinas (129). A enzima Peroxidase do Eosinófilo é uma proteína contendo um grupo heme que representa a proteína mais abundante dos grânulos. Esta

proteína, codificada pelo gene *EPX*, é específica para os eosinófilos e apresenta atividade imunoreguladora, provocando a desgranulação dos mastócitos, ativação de plaquetas e aumenta as capacidades fagocíticas dos macrófagos (130–132). A Peroxidase do eosinófilo apresenta similaridade com a Mieloperoxidase (MPO), cuja expressão é restrita a células mielóides. A expressão ativa desta proteína ocorre durante a fase de promielócito, isto é, durante uma etapa precursora das células de linha hematopoiética mielóide (133). Assim, a elevada expressão do gene *EPX* corresponde a uma expressão aumentada da proteína Peroxidase do Eosinófilo que, por analogia com a proteína MPO, revela a presença de uma maior percentagem de células precursoras.

Integrando as alterações imunofenotípicas evidenciadas nas diferentes linhas hematopoiéticas estudadas com as alterações funcionais observadas em populações celulares de basófilos e eosinófilos, conclui-se que, neste estudo, há claramente predomínio de células imaturas do ponto de vista imunofenotípico e funcional em doentes diagnosticados com Síndrome Mielodisplásica.



## **Conclusão**

---



## Capítulo 11-Conclusão

As linhas minoritárias da MO, nomeadamente, a linha a basófilo, eosinófilo, célula dendrítica plasmacitóide e mastócito, não apresentaram bloqueios maturativos. Contudo, e há semelhança das linhas maioritárias da MO, estas linhas hematopoiéticas apresentaram alterações na expressão de diferentes recetores celulares, nomeadamente o aumento de expressão dos recetores CD44 e CD45 transversal às diferentes linhas em estudo.

Observaram-se, ainda, alterações intrínsecas a cada linha hematopoiética, como o decréscimo na expressão de CD13 na linha a basófilo e de CD35 e CD64 na linha a eosinófilo e aumento de expressão de CD117 e HLA-DR na linha a mastócito.

Na expressão dos genes *Triptase* e *Peroxidase do Eosinófilo* as amostras com diagnóstico de SMD apresentaram uma maior expressão dos genes em estudo.

Este estudo reforça o contributo da citometria de fluxo para o diagnóstico da SMD, permitindo a identificação de rasgos fenotípicos displásicos em praticamente todas as linhas hematopoiéticas, com exceção da linha megacariocítica, o que pode permitir um melhor diagnóstico e estratificação dos doentes. A título de exemplo o grupo CRDU, do ponto de vista fenotípico, apresentava pelo menos 2 linhas afetadas em 6 dos 8 casos estudados.



## **Referências**

---



## Capítulo 12-Referências

1. Valent P, Horny H-P, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, Haferlach T, Haase D, Kolb H-J, Krieger O, Loken M, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Pfeilstöcker M, Rüter B, Sperr WR, Stauder R, Wells DA. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res.* 2007;31(6):727–36.
2. Bejar R, Levine R, Ebert BL. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2011;29(5):504–15.
3. Jonas BA, Ph D, Greenberg PL. Best Practice & Research Clinical Haematology MDS prognostic scoring systems e Past , present , and future. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2015;28(1):3–13.
4. Bowen DT. Occupational and environmental etiology of MDS. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2013;26(4):319–26.
5. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, Marcos-Gragera R, Maynadié M, Simonetti A, Lutz J-M, Berrino F. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the Haemacare project. *Blood.* 2010;116(19):3724–34.
6. Rhoads CP, Barker WH. Refractory Anemia. *J Am Med Assoc.* 1938;110(11):794.
7. Block M. Preleukemic Acute Human Leukemia. *J Am Med Assoc.* 1953;152(11):1018.
8. Bjorkman SE. Chronic refractory anemia with sideroblastic bone marrow; a study of four cases. *Blood.* 1956;11(3):250–9.
9. Dameshek W. Foreword and a proposal for considering paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) as a “candidate” myeloproliferative disorder. *Blood.* 1969;33(2):263–4.
10. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood.* 1951;6(4):372–5.
11. Fisher WB. “Preleukemia.” *Arch Intern Med.* 1973;132(2):226.
12. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br J Haematol.* 1976;33(4):451–8.
13. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1982;51(2):189–99.

14. Strom SS, Vélez-Bravo V, Estey EH. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol*. 2008;45(1):8–13.
15. Irons RD, Gross SA, Le A, Wang XQ, Chen Y, Ryder J, Schnatter AR. Integrating WHO 2001-2008 criteria for the diagnosis of Myelodysplastic Syndrome (MDS): a case-case analysis of benzene exposure. *Chem Biol Interact*. 2010;184(1-2):30–8.
16. Du Y, Fryzek J, Sekeres MA, Taioli E. Smoking and alcohol intake as risk factors for myelodysplastic syndromes (MDS). *Leuk Res*. 2010;34(1):1–5.
17. Björk J, Albin M, Mauritzson N, Strömberg U, Johansson B, Hagmar L. Smoking and myelodysplastic syndromes. *Epidemiology*. 2000;11(3):285–91.
18. Smith SM, Le Beau MM, Huo D, Karrison T, Sobecks RM, Anastasi J, Vardiman JW, Rowley JD, Larson RA. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood*. 2003;102(1):43–52.
19. Babushok D V, Bessler M. Genetic predisposition syndromes: when should they be considered in the work-up of MDS? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2015;28(1):55–68.
20. Pabst T, Eyholzer M, Haefliger S, Schardt J, Mueller BU. Somatic CEBPA mutations are a frequent second event in families with germline CEBPA mutations and familial acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2008;26(31):5088–93.
21. Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med*. 2009;361:1872–85.
22. Kerbaui DMB, Lesnikov V, Torok-Storb B, Bryant E, Deeg HJ. Engraftment of distinct clonal MDS-derived hematopoietic precursors in NOD/SCID-beta2-microglobulin-deficient mice after intramedullary transplantation of hematopoietic and stromal cells. *Blood*. 2004;104(7):2202–3.
23. Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood*. 2009;114(6):1150–7.
24. Park CY, Tseng D, Weissman IL. Cancer stem cell-directed therapies: recent data from the laboratory and clinic. *Mol Ther*. 2009;17(2):219–30.
25. Challen GA, Sun D, Jeong M, Luo M, Jelinek J, Berg JS, Bock C, Vasanthakumar A, Gu H, Xi Y, Liang S, Lu Y, Darlington GJ, Meissner A, Issa J-PJ, Godley LA, Li W, Goodell MA. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet*. 2011;44(1):23–31.
26. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003;349(21):2042–54.



27. Tien H-F, Tang J-L, Tsay W, Liu M-C, Lee F-Y, Wang C-H, Chen Y-C, Shen M-C. Methylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndrome: it can be detected early at diagnosis or during disease progression and is highly associated with leukaemic transformation. *Br J Haematol*. 2001;112(1):148–54.
28. Fenrick R, Hiebert SW. Role of histone deacetylases in acute leukemia. *J Cell Biochem Suppl*. 1998;30-31:194–202.
29. Nolte F, Hofmann W-K. Molecular mechanisms involved in the progression of myelodysplastic syndrome. *Future Oncol*. 2010;6(3):445–55.
30. Kerbaudy DB, Deeg HJ. Apoptosis and antiapoptotic mechanisms in the progression of myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol*. 2007;35(11):1739–46.
31. Gyan E, Frisan E, Beyne-Rauzy O, Deschemin J-C, Pierre-Eugene C, Randriamampita C, Dubart-Kupperschmitt A, Garrido C, Dreyfus F, Mayeux P, Lacombe C, Solary E, Fontenay M. Spontaneous and Fas-induced apoptosis of low-grade MDS erythroid precursors involves the endoplasmic reticulum. *Leukemia*. 2008;22(10):1864–73.
32. Chamuleau MED, Westers TM, van Dreunen L, Groenland J, Zevenbergen A, Eeltink CM, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA. Immune mediated autologous cytotoxicity against hematopoietic precursor cells in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2009;94(4):496–506.
33. Fozza C, Contini S, Galleu A, Simula MP, Viridis P, Bonfigli S, Longinotti M. Patients with myelodysplastic syndromes display several T-cell expansions, which are mostly polyclonal in the CD4(+) subset and oligoclonal in the CD8(+) subset. *Exp Hematol*. 2009;37(8):947–55.
34. Tsimberidou AM, Estey E, Wen S, Pierce S, Kantarjian H, Albitar M, Kurzrock R. The prognostic significance of cytokine levels in newly diagnosed acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer*. 2008;113(7):1605–13.
35. Raaijmakers MHGP, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, Ebert BL, Al-Shahrour F, Hasserjian RP, Scadden EO, Aung Z, Matza M, Merkenschlager M, Lin C, Rommens JM, Scadden DT. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*. 2010;464(7290):852–7.
36. Fontenay M, Gyan E. Apoptotic pathways to death in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2008;93(9):1288–92.
37. Macedo LC, Silvestre APA, Rodrigues C, de Alencar JB, Zacarias JMV, Ambrosio-Albuquerque EP, Sell AM, Visentainer JEL. Genetics factors associated with myelodysplastic syndromes. *Blood Cells Mol Dis*. 2015;55(1):76–81.
38. Boultonwood J. Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of

- the 5q- syndrome. *Blood*. 2002;99(12):4638–41.
39. Graubert TA, Payton MA, Shao J, Walgren RA, Monahan RS, Frater JL, Walshauser MA, Martin MG, Kasai Y, Walter MJ. Integrated genomic analysis implicates haploinsufficiency of multiple chromosome 5q31.2 genes in de novo myelodysplastic syndromes pathogenesis. *PLoS One*. 2009;4(2):e4583.
  40. Liu TX, Becker MW, Jelinek J, Wu W-S, Deng M, Mikhalkovich N, Hsu K, Bloomfield CD, Stone RM, DeAngelo DJ, Galinsky IA, Issa J-P, Clarke MF, Look AT. Chromosome 5q deletion and epigenetic suppression of the gene encoding alpha-catenin (CTNNA1) in myeloid cell transformation. *Nat Med*. 2007;13(1):78–83.
  41. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, Kundgen A, Lübbert M, Kunzmann R, Giagounidis AAN, Aul C, Trümper L, Krieger O, Stauder R, Müller TH, Wimazal F, Valent P, Fonatsch C, Steidl C. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007;110(13):4385–95.
  42. Döhner K, Brown J, Hehmann U, Hetzel C, Stewart J, Lowther G, Scholl C, Fröhling S, Cuneo A, Tsui LC, Lichter P, Scherer SW, Döhner H. Molecular cytogenetic characterization of a critical region in bands 7q35–q36 commonly deleted in malignant myeloid disorders. *Blood*. 1998;92(11):4031–5.
  43. Wong JCY, Zhang Y, Lieu KH, Tran MT, Forgo E, Weinfurter K, Alzamora P, Kogan SC, Akagi K, Wolff L, Le Beau MM, Killeen N, Shannon K. Use of chromosome engineering to model a segmental deletion of chromosome band 7q22 found in myeloid malignancies. *Blood*. 2010;115(22):4524–32.
  44. Sloand EM, Wu CO, Greenberg P, Young N, Barrett J. Factors affecting response and survival in patients with myelodysplasia treated with immunosuppressive therapy. *J Clin Oncol*. 2008;26(15):2505–11.
  45. Wang PW, Eisenbart JD, Espinosa R, Davis EM, Larson RA, Le Beau MM. Refinement of the smallest commonly deleted segment of chromosome 20 in malignant myeloid diseases and development of a PAC-based physical and transcription map. *Genomics*. 2000;67(1):28–39.
  46. Wiktor A, Rybicki BA, Piao ZS, Shurafa M, Barthel B, Maeda K, Van Dyke DL. Clinical significance of Y chromosome loss in hematologic disease. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000;27(1):11–6.
  47. Langemeijer SMC, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, Stevens-Linders E, van Hoogen P, van Kessel AG, Raymakers RAP, Kamping EJ, Verhoef GE, Verburgh E, Hagemeijer A, Vandenberghe P, de Witte T, van der Reijden BA, Jansen JH. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2009;41(7):838–42.
  48. Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, Brecqueville M, Adélaïde J, Rey J, Vainchenker

- W, Bernard OA, Chaffanet M, Vey N, Birnbaum D, Mozziconacci MJ. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2009;23(11):2183–6.
49. Chen C-Y, Lin L-I, Tang J-L, Ko B-S, Tsay W, Chou W-C, Yao M, Wu S-J, Tseng M-H, Tien H-F. RUNX1 gene mutation in primary myelodysplastic syndrome--the mutation can be detected early at diagnosis or acquired during disease progression and is associated with poor outcome. *Br J Haematol*. 2007;139(3):405–14.
  50. Matheny CJ, Speck ME, Cushing PR, Zhou Y, Corpora T, Regan M, Newman M, Roudaia L, Speck CL, Gu T-L, Griffey SM, Bushweller JH, Speck NA. Disease mutations in RUNX1 and RUNX2 create nonfunctional, dominant-negative, or hypomorphic alleles. *EMBO J*. 2007;26(4):1163–75.
  51. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Slama L, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, Quesnel B, Hunault-Berger M, Slama B, Vey N, Lacombe C, Solary E, Birnbaum D, Bernard OA, Fontenay M. Mutations of IDH1 and IDH2 genes in early and accelerated phases of myelodysplastic syndromes and MDS/myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2010;24(5):1094–6.
  52. Barlow JL, Drynan LF, Hewett DR, Holmes LR, Lorenzo-Abalde S, Lane AL, Jolin HE, Pannell R, Middleton AJ, Wong SH, Warren AJ, Wainscoat JS, Boultonwood J, McKenzie ANJ. A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nat Med*. 2010;16(1):59–66.
  53. Kita-Sasai Y, Horiike S, Misawa S, Kaneko H, Kobayashi M, Nakao M, Nakagawa H, Fujii H, Taniwaki M. International prognostic scoring system and TP53 mutations are independent prognostic indicators for patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 2001;115(2):309–12.
  54. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(7):493–505.
  55. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, Ehninger G. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006;107(10):4011–20.
  56. Zhang Y, Zhang M, Yang L, Xiao Z. NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Leuk Res*. 2007;31(1):109–11.
  57. Sportoletti P, Grisendi S, Majid SM, Cheng K, Clohessy JG, Viale A, Teruya-Feldstein J, Pandolfi PP. Npm1 is a haploinsufficient suppressor of myeloid and lymphoid malignancies in the mouse. *Blood*. 2008;111(7):3859–62.
  58. Foran JM, Shammo JM. Clinical presentation, diagnosis, and prognosis of myelodysplastic syndromes. *Am J Med*. 2012;125(7 Suppl):S6–13.
  59. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100(7):2292–302.

60. Swerdlow S, Harris N, Jaffe E, Al. E. WHO Classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon IARC Press. 2008;
61. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–405.
62. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenau P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89(6):2079–88.
63. Steensma DP. Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2015;90(7):969–83.
64. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, Bennett JM, Bowen D, Fenau P, Dreyfus F, Kantarjian H, Kuendgen A, Levis A, Malcovati L, Cazzola M, Cermak J, Fonatsch C, Le Beau MM, Slovak ML, Krieger O, Luebbert M, Maciejewski J, Magalhaes SMM, Miyazaki Y, Pfeilstöcker M, Sekeres M, Sperr WR, Stauder R, Tauro S, Valent P, Vallespi T, van de Loosdrecht AA, Germing U, Haase D. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454–65.
65. Steensma DP, Bennett JM. The myelodysplastic syndromes: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(1):104–30.
66. Grattinger D, Greenberg PL. Update on Myelodysplastic Syndromes Classification and Prognosis. *Surg Pathol Clin*. 2013;6(4):693–728.
67. Loken MR, Loosdrecht A Van De, Ogata K, Orfao A, Wells DA. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes : Report from a working conference. 2008;32:5–17.
68. Porwit A, van de Loosdrecht AA, Bettelheim P, Brodersen LE, Burbury K, Cremers E, Della Porta MG, Ireland R, Johansson U, Matarraz S, Ogata K, Orfao A, Preijers F, Psarra K, Subirá D, Valent P, van der Velden VHJ, Wells D, Westers TM, Kern W, Béné MC. Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes-proposal from the International/European LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS. *Leukemia*. 2014;28(9):1793–8.
69. Robinson JP, Rajwa B, Patsekin V, Davisson VJ. Computational analysis of high-throughput flow cytometry data. *Expert Opin Drug Discov*. 2012;7(8):679–93.
70. Zilmer NA, Godavarti M, Rodriguez JJ, Yopp TA, Lambert GM, Galbraith DW. Flow cytometric analysis using digital signal processing. *Cytometry*. 1995;20(2):102–17.

71. Shapiro HM, Perlmutter NG, Stein PG. A flow cytometer designed for fluorescence calibration. *Cytometry*. 1998;33(2):280–7.
72. Pedreira CE, Costa ES, Lecrevisse Q, van Dongen JJM, Orfao A. Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. *Trends Biotechnol*. 2013;31(7):415–25.
73. Watkins NA, Gusnanto A, de Bono B, De S, Miranda-Saavedra D, Hardie DL, Angenent WGJ, Attwood AP, Ellis PD, Erber W, Foad NS, Garner SF, Isacke CM, Jolley J, Koch K, Macaulay IC, Morley SL, Rendon A, Rice KM, Taylor N, Thijssen-Timmer DC, Tijssen MR, van der Schoot CE, Wernisch L, Winzer T, Dudbridge F, Buckley CD, Langford CF, Teichmann S, Göttgens B, Ouwehand WH. A HaemAtlas: characterizing gene expression in differentiated human blood cells. *Blood*. 2009;113(19):e1–9.
74. Stelzer GT, Shults KE, Loken MR. CD45 Gating for Routine Flow Cytometric Analysis of Human Bone Marrow Specimens. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;677:265–80.
75. Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, Stelzer GT. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J Clin Pathol*. 1993;100(5):534–40.
76. Westers TM, Ireland R, Kern W, Alhan C, Balleisen JS, Bettelheim P, Burbury K, Cullen M, Cutler JA, Della Porta MG, Dräger AM, Feuillard J, Font P, Germing U, Haase D, Johansson U, Kordasti S, Loken MR, Malcovati L, te Marvelde JG, Matarraz S, Milne T, Moshaver B, Mufti GJ, Ogata K, Orfao A, Porwit A, Psarra K, Richards SJ, Subirá D, Tindell V, Vallespi T, Valent P, van der Velden VHJ, de Witte TM, Wells DA, Zettl F, Béné MC, van de Loosdrecht AA. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia*. 2012;26(7):1730–41.
77. Hurwitz CA, Loken MR, Graham ML, Karp JE, Borowitz MJ, Pullen DJ, Civin CI. Asynchronous antigen expression in B lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1988;72(1):299–307.
78. Wells DA, Sale GE, Shulman HM, Myerson D, Bryant EM, Gooley T, Loken MR. Multidimensional flow cytometry of marrow can differentiate leukemic from normal lymphoblasts and myeloblasts after chemotherapy and bone marrow transplantation. *Am J Clin Pathol*. 1998;110(1):84–94.
79. Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N, Xie XY, Molldrem J, Barrett AJ, Venzon D, Rick ME. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2001;98(4):979–87.
80. Orfao A, Ortuño F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry A*. 2004;58(1):62–71.

81. Lorand-Metze I, Ribeiro E, Lima CSP, Batista LS, Metze K. Detection of hematopoietic maturation abnormalities by flow cytometry in myelodysplastic syndromes and its utility for the differential diagnosis with non-clonal disorders. *Leuk Res.* 2007;31(2):147–55.
82. Wells DA, Benesch M, Loken MR, Vallejo C, Myerson D, Leisenring WM, Deeg HJ. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2003;102(1):394–403.
83. Porta MG Della, Malcovati L, Invernizzi R, Travaglino E, Pascutto C, Maffioli M, Galli A, Boggi S, Pietra D, Vanelli L, Marseglia C, Levi S, Arosio P, Lazzarino M, Cazzola M. Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia.* 2006;20(4):549–55.
84. Matarraz S, López A, Barrena S, Fernandez C, Jensen E, Flores-Montero J, Rasillo A, Sayagues JM, Sánchez ML, Bárcena P, Hernandez-Rivas JM, Salvador C, Fernandez-Mosteirín N, Giralt M, Perdiguier L, Laranjeira P, Paiva A, Orfao A. Bone marrow cells from myelodysplastic syndromes show altered immunophenotypic profiles that may contribute to the diagnosis and prognostic stratification of the disease: a pilot study on a series of 56 patients. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78(3):154–68.
85. Lyons RM. Myelodysplastic syndromes: therapy and outlook. *Am J Med.* 2012;125(7 Suppl):S18–23.
86. Fenaux P, Adès L. How we treat lower-risk myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2013;121(21):4280–6.
87. List A, Kurtin S, Roe DJ, Buresh A, Mahadevan D, Fuchs D, Rimsza L, Heaton R, Knight R, Zeldis JB. Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med.* 2005;352(6):549–57.
88. Santini V. Clinical use of erythropoietic stimulating agents in myelodysplastic syndromes. *Oncologist.* 2011;16 Suppl 3(suppl 3):35–42.
89. Tehranchi R, Fadeel B, Forsblom A-M, Christensson B, Samuelsson J, Zhivotovsky B, Hellstrom-Lindberg E. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits spontaneous cytochrome c release and mitochondria-dependent apoptosis of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitors. *Blood.* 2003;101(3):1080–6.
90. Greenberg PL, Attar E, Bennett JM, Bloomfield CD, De Castro CM, Deeg HJ, Foran JM, Gaensler K, Garcia-Manero G, Gore SD, Head D, Komrokji R, Maness LJ, Millenson M, Nimer SD, O'Donnell MR, Schroeder MA, Shami PJ, Stone RM, Thompson JE, Westervelt P. Myelodysplastic Syndromes. *J Natl Compr Canc Netw.* 2011;9(1):30–56.
91. Sekeres MA, Cutler C. How we treat higher-risk myelodysplastic syndromes. *Blood.*

- 2014;123(6):829–36.
92. Zeidan AM, Faltas B, Douglas Smith B, Gore S. Myelodysplastic syndromes: what do hospitalists need to know? *J Hosp Med*. 2013;8(6):351–7.
  93. Griffiths EA, Gore SD. Epigenetic therapies in MDS and AML. *Adv Exp Med Biol*. 2013;754:253–83.
  94. Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2015 Update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2015;90(9):831–41.
  95. Beran M, Shen Y, Kantarjian H, O'Brien S, Koller CA, Giles FJ, Cortes J, Thomas DA, Faderl S, Despa S, Estey EH. High-dose chemotherapy in high-risk myelodysplastic syndrome: covariate-adjusted comparison of five regimens. *Cancer*. 2001;92(8):1999–2015.
  96. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, Rawstron A, Asnafi V, Lécrovisse Q, Lucio P, Mejstrikova E, Szczepański T, Kalina T, de Tute R, Brüggemann M, Sedek L, Cullen M, Langerak AW, Mendonça A, Macintyre E, Martin-Ayuso M, Hrusak O, Vidriales MB, Orfao A, EuroFlow Consortium (EU-FP6 L-C-2006-018708). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908–75.
  97. Laranjeira P, Rodrigues R, Carneiro T, Vitória H, Matarraz S, Trindade H, Órfão A, Paiva A. Expression of CD44 and CD35 during normal and myelodysplastic erythropoiesis. 2015;39:361–70.
  98. Nagano O, Saya H. Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci*. 2004;95(12):930–5.
  99. Knudson C, Knudson W. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J*. 1993;7(13):1233–41.
  100. Bourguignon LYW, Shiina M, Li J-J. Hyaluronan-CD44 interaction promotes oncogenic signaling, microRNA functions, chemoresistance, and radiation resistance in cancer stem cells leading to tumor progression. *Adv Cancer Res*. 2014;123:255–75.
  101. Godar S, Ince TA, Bell GW, Feldser D, Donaher JL, Bergh J, Liu A, Miu K, Watnick RS, Reinhardt F, McAllister SS, Jacks T, Weinberg RA. Growth-inhibitory and tumor-suppressive functions of p53 depend on its repression of CD44 expression. *Cell*. 2008;134(1):62–73.
  102. Loeffler-Ragg J, Germing U, Sperr WR, Herrmann H, Zwierzina H, Valent P, Ulmer H, Stauder R. Serum CD44 levels predict survival in patients with low-risk myelodysplastic syndromes. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011;78(2):150–61.

103. Charbonneau H, Tonks NK, Walsh KA, Fischer EH. The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(19):7182–6.
104. Hurley TR, Hyman R, Sefton BM. Differential effects of expression of the CD45 tyrosine protein phosphatase on the tyrosine phosphorylation of the lck, fyn, and c-src tyrosine protein kinases. *Mol Cell Biol*. 1993;13(3):1651–6.
105. Bjorge JD, Pang AS, Funnell M, Chen KY, Diaz R, Magliocco AM, Fujita DJ. Simultaneous siRNA targeting of Src and downstream signaling molecules inhibit tumor formation and metastasis of a human model breast cancer cell line. *PLoS One*. 2011;6(4):e19309.
106. Ingley E. Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1784(1):56–65.
107. Saunders AE, Johnson P. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. *Cell Signal*. 2010;22(3):339–48.
108. Del Cañizo MC, Fernández ME, López A, Vidriales B, Villarón E, Arroyo JL, Ortuño F, Orfao A, San Miguel JF. Immunophenotypic analysis of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2003;88(4):402–7.
109. Mason KD, Juneja SK, Szer J. The immunophenotype of acute myeloid leukemia: is there a relationship with prognosis? *Blood Rev*. 2006;20(2):71–82.
110. Moulds JM, Nickells MW, Moulds JJ, Brown MC, Atkinson JP. The C3b/C4b receptor is recognized by the Knops, McCoy, Swain-langley, and York blood group antisera. *J Exp Med*. 1991;173(5):1159–63.
111. Hulett MD, Hogarth PM. The second and third extracellular domains of FcγRI (CD64) confer the unique high affinity binding of IgG2a. *Mol Immunol*. 1998;35(14-15):989–96.
112. Nimmerjahn F, Ravetch J V. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity*. 2006;24(1):19–28.
113. Stachurski D, Smith BR, Pozdnyakova O, Andersen M, Xiao Z, Raza A, Woda BA, Wang SA. Flow cytometric analysis of myelomonocytic cells by a pattern recognition approach is sensitive and specific in diagnosing myelodysplastic syndrome and related marrow diseases: Emphasis on a global evaluation and recognition of diagnostic pitfalls. *Leuk Res*. 2008;32(2):215–24.
114. Wood B. Multicolor Immunophenotyping: Human Immune System Hematopoiesis. *Methods Cell Biol*. 2004;75:559–76.
115. Arber DA, Tamayo R, Weiss LM. Paraffin section detection of the c-kit gene product (CD 117) in human tissues: Value in the diagnosis of mast cell disorders. *Hum Pathol*.



1998;29(5):498–504.

116. Tsuura Y, Hiraki H, Watanabe K, Igarashi S, Shimamura K, Fukuda T, Suzuki T, Seito T. Preferential localization of c-kit product in tissue mast cells, basal cells of skin, epithelial cells of breast, small cell lung carcinoma and seminoma/dysgerminoma in human: immunohistochemical study on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch.* 1994;424(2):135–41.
117. Mrinal M. Patnaik BSP, Ayalew Tefferi BSP, Animesh Pardhanani BSP. Kit: Molecule of Interest for the Diagnosis and Treatment of Mastocytosis and other Neoplastic Disorders. *Curr Cancer Drug Targets.* 2007;7(5):492–503.
118. Kong Y, Si L, Zhu Y, Xu X, Corless CL, Flaherty KT, Li L, Li H, Sheng X, Cui C, Chi Z, Li S, Han M, Mao L, Lu A, Guo J. Large-scale analysis of KIT aberrations in Chinese patients with melanoma. *Clin Cancer Res.* 2011;17(7):1684–91.
119. Accolla RS, Adorini L, Sartoris S, Sinigaglia F, Guardiola J. MHC: orchestrating the immune response. *Immunol Today.* 1995;16(1):8–11.
120. Kaneko T, Okiji T, Kan L, Takagi M, Suda H. Ultrastructural analysis of MHC class II molecule-expressing cells in experimentally induced periapical lesions in the rat. *J Endod.* 2001;27(5):337–42.
121. Sánchez-Muñoz L, Teodósio C, Morgado JM EL. Immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells in mastocytosis and other mast cell disorders. *Elsevier.* 2011;103:333–59.
122. Escribano L, Ocqueteau M, Almeida J, Orfao A, San Miguel JF. Expression of the c-kit (CD117) molecule in normal and malignant hematopoiesis. *Leuk Lymphoma.* 1998;30(5-6):459–66.
123. Karasuyama H, Mukai K, Obata K, Tsujimura Y, Wada T. Nonredundant roles of basophils in immunity. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:45–69.
124. Miller JS, Moxley G, Schwartz LB. Cloning and characterization of a second complementary DNA for human tryptase. *J Clin Invest.* 1990;86(3):864–70.
125. Sperr WR, Hauswirth AW, Valent P. Tryptase a novel biochemical marker of acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2002;43(12):2257–61.
126. Sperr WR, Jordan JH, Baghestanian M, Kiener HP, Samorapoompichit P, Semper H, Hauswirth A, Schernthaner GH, Chott A, Natter S, Kraft D, Valenta R, Schwartz LB, Geissler K, Lechner K, Valent P. Expression of mast cell tryptase by myeloblasts in a group of patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2001;98(7):2200–9.
127. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* NIH Public Access; 2010;125:S73–80.

128. Karasuyama H, Mukai K, Tsujimura Y, Obata K. Newly discovered roles for basophils: a neglected minority gains new respect. *Nat Rev.* 2009;9(1):9–13.
129. Flier JS, Underhill LH, Weller PF. The Immunobiology of Eosinophils. *N Engl J Med.* 1991;324(16):1110–8.
130. Rohrbach MS, Wheatley CL, Slifman NR, Gleich GJ. Activation of platelets by eosinophil granule proteins. *J Exp Med.* 1990;172(4):1271–4.
131. Lefkowitz DL, Lincoln JA, Howard KR, Stuart R, Lefkowitz SS, Allen RC. Macrophage-Mediated Candidacidal Activity is Augmented by Exposure to Eosinophil Peroxidase: A Paradigm for Eosinophil-Macrophage Interaction. *Inflammation.* 1997;21(2):159–72.
132. Carlson MG, Peterson CG, Venge P. Human eosinophil peroxidase: purification and characterization. *J Immunol.* 1985;134(3):1875–9.
133. Hansson M, Olsson I, Nauseef WM. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys.* 2006;445(2):214–24.